

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

BRUNA TODESCHINI VIEIRA

DETERMINAÇÃO DO SEXO EM ARARAS (*Ara ararauna*, *A. macao* E *A. chloropterus*) POR ENZIMOIMUNOENSAIO DE METABÓLITOS DE ESTEROIDES SEXUAIS A PARTIR DE EXCRETAS

CURITIBA

2019

BRUNA TODESCHINI VIEIRA

DETERMINAÇÃO DO SEXO EM ARARAS (*Ara ararauna*, *A. macao* E *A. chloropterus*) POR ENZIMOIMUNOENSAIO DE METABÓLITOS DE ESTEROIDES SEXUAIS A PARTIR DE EXCRETAS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Zoologia, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Zoologia.

Orientador: Prof. Dr. Nei Moreira

Coorientadora: Dra. Janine Brown

CURITIBA

2019

Universidade Federal do Paraná. Sistema de Bibliotecas.
Biblioteca de Ciências Biológicas.
(Giana Mara Seniski Silva – CRB/9 1406)

Vieira, Bruna Todeschini

Determinação do sexo em araras (*Ara ararauna*, *A. macao* e *A. chloropterus*) por ensaio imunoenzimático de metabólitos de esteroides sexuais a partir de excretas. / Bruna Todeschini Vieira. – Curitiba, 2019.
72 p.: il.

Orientador: Nei Moreira

Coorientador: Janine Brown

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Zoologia.

1. Arara 2. Endocrinologia 3. Progesterona 4. Testosterona I. Título
II. Moreira, Nei III. Brown, Janine IV. Universidade Federal do Paraná.
Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Zoologia.

CDD (22. ed.) 598.71



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO ZOOLOGIA -
40001016008P4

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em ZOOLOGIA da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da dissertação de Mestrado de **BRUNA TODESCHINI VIEIRA** intitulada: **Determinação do sexo em araras (*Ara ararauna*, *A. macao* e *A. chloropterus*) por ensaio imunoenzimático de metabólitos de esteróides sexuais a partir de excretas**, após terem inquirido a aluna e realizado a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de mestre está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

Curitiba, 22 de Fevereiro de 2019.

NEI MOREIRA

Presidente da Banca Examinadora (UFPR)

EDUARDO ANTUNES DIAS

Avaliador Externo (FURG)

ROGÉRIO RIBAS LANGE

Avaliador Externo (UFPR)

Dedico este trabalho a todas as mulheres, aquelas que lutam pela sua independência, e àquelas que ainda não descobriram o que é ser livre; a todos os aspirantes a cientistas nesse Brasil, onde a pesquisa é desvalorizada e mesmo assim continuamos a desenvolver nosso trabalho.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, que não mediram esforços para me ajudar de todas as maneiras que precisei. A toda minha família que, apesar de tudo, sempre apoiaram o que fiz.

À Profa. Dra. Katherine Maria Spencoski, minha heroína, apareceu no momento mais crítico. Graças à Profa. Dra. Aline Viott, compadeceu-se e aliou-se a mim, profissional e pessoalmente, tornou-se uma querida amiga e me ajudou até o fim, não me deixou desanimar, ouviu reclamações, choros, gritos de desespero e de alegria. Mas se não fosse você, o projeto não teria saído do lugar. Serei eternamente agradecida.

Ao Programa de Pós-graduação em Zoologia que recebeu de braços abertos, no meio dos biólogos, uma médica veterinária. Encontrei amigos, irmãos, colegas e muitas pessoas dispostas a me ouvir e ajudar. Obrigada Vanessa, Douglas e Fabiane, secretários que estavam sempre dispostos. Aos Professores Marcos Barbeitos, Luis Fernando Fávaro, Lilian Manica, Marcio Pie e outros envolvidos nas aprovações de prorrogação, por compreenderem as dificuldades, ajudarem nos momentos nos quais não via mais solução.

À CAPES, pela concessão da bolsa;

Ao meu orientador, Nei Moreira;

À minha coorientadora Dra. Janine Brown. Thank you for helping me learn and develop everything I know about endocrinology; for listening to me when I did not know where to run, for all the meetings and analyzes conducted at a distance;

Aos amigos da pós-graduação, especialmente as minhas amadas Geissiane, Laís, Joyce, Francielly – pelas risadas, pela parceria, pelos dias passados juntos até tarde da noite, pela amizade, pelos abraços, pela companhia.

Olimpio Rafael, pelas caronas concedidas e todos os conselhos. Carolina Adam, pelo seu empenho em me ajudar com os problemas do projeto. Roger, Daliana, Larissa, André Confetti, André Olivotto, Pedro Calixto, Pedro Ribeiro, obrigada pela parceria, por escutarem, aguentarem e estarem por perto até agora.

Às meninas da pensão FHS 555, que eram uma grande família;

À Raíssa e Vanessa, da “casa das três mulheres” por terem me recebido tão bem na sua casa.

Aos amigos de Curitiba, Juliano, Rhayene, Alex Quadros, Mariana Brod, por terem me recebido e me acalentado; todos os outros que conheci no caminho e que estão juntos comigo até hoje;

Aos amigos de Cascavel que compreenderam a ausência, ouviram as reclamações, acompanharam todo o caminho e agora podem, juntos comigo, comemorar o sucesso; à Marina Machado por constelar essa questão e hoje estarmos aqui perto de encerrar esse ciclo;

Ao Gabriel Vagetti, que permaneceu ao meu lado durante os primeiros anos, suportou a distância, ouviu meu sofrimento, apoiou minhas decisões e foi uma das pessoas mais importantes da minha vida;

À equipe de colegas veterinárias, Dayane e Charlene por terem dado um voto de confiança e me ensinarem muito do que sei como veterinária; Tatiane por me compreender, me ensinar, me consolar, me ouvir, obrigada por tudo, “chefinha”. À Letícia e Juliana pela amizade, por toda a ajuda e ensino; à Thalita e Maely pela parceria, ajuda e todas as risadas;

À equipe do Zoológico Municipal de Cascavel, Vanilce, Ilair Detoni, Adriana, Amilton, Seu Jonas e todos os outros que abriram as portas, nos receberam sem pestanejar, nos ajudaram no que puderam e eram sempre muito solícitos;

Ao Laboratório de Fisiologia Endócrina e Reprodutiva Animal (LABFERA) e ao Prof. Anderson, por ter nos recebido, permitido que realizássemos as análises e nos ajudado.

A Deus e a Nossa Senhora Aparecida,

Aos animais mais majestosos do mundo, as araras.

RESUMO GERAL

As araras, como todos os psitacídeos, chamam atenção pela beleza, cores, carisma e pela habilidade de repetir palavras e canções. Com a evolução das pesquisas em espécies silvestres, surgem vários dados e novas informações sobre aspectos como comportamento, reprodução, fisiologia. Nessas espécies, a coleta de amostras para monitoramento hormonal sempre foi um desafio. Coletas de sangue são difíceis de serem realizadas, pois muitas vezes exigem a contenção física do animal, que causa estresse, ou até uma sedação ou anestesia, o que acaba dificultando ou impossibilitando coletas frequentes. As técnicas de dosagem hormonal não invasivas vieram como uma boa opção, realizando a análise destes hormônios ou seus metabólitos. Estes são excretados nas fezes, urina, excretas, pelos ou saliva, permitindo o acompanhamento por longos períodos, pois em muitos casos, não exigem manipular o animal. As amostras mais utilizadas são fezes e urina e, no caso das aves, excretas. A maioria das espécies de psitacídeos não apresenta dimorfismo sexual, dificultando a diferenciação entre machos e fêmeas. As técnicas de sexagem foram desenvolvidas para facilitar e simplificar, mas as amostras de sangue comumente usadas exigem uma coleta que pode ser perigosa e estressante tanto para o animal quanto para o manipulador. Podem ser utilizadas pequenas amostras de sangue coletadas pela retirada de uma pena viável, o que exige contenção e causa dor e desconforto ao animal. A dosagem hormonal pode ser usada com sucesso para a sexagem. Neste trabalho, foram coletadas excretas de 17 araras (13 *Ara ararauna*, 3 *A. macao* e 1 *A. chloropterus*), sendo 10 machos e 7 fêmeas, do Zoológico Municipal de Cascavel (Parque Municipal Danilo Galafassi), três amostras de cada animal, durante o mês de fevereiro de 2018. Todos os animais tiveram seus sexos previamente definidos pela Reação de Cadeia da Polimerase (PCR). A técnica de enzimoimunoensaio foi validada para progestágenos e andrógenos para essas três espécies de araras brasileiras e, a partir disso, utilizou-se uma razão entre progestágenos/andrógenos para a sexagem. Foi utilizada a razão entre os dois esteroides, pois ambos são encontrados tanto em fêmeas quanto em machos e, o que se esperava, era uma concentração de progestágenos maior em fêmeas, e de andrógenos maior em machos. Os resultados estão expressos na forma de média \pm erro padrão da média (SEM). A concentração de andrógenos não diferiu significativamente ($p=0,378$) entre machos ($74,2 \pm 5,6$ pg/g) e fêmeas ($66,0 \pm 7,3$ pg/g), mas a concentração de progestágenos teve uma diferença significativa entre os sexos (fêmeas = $204,7 \pm 36,7$ pg/g; machos = $90,8 \pm 9,4$ pg/g; $p=0,0012$). A razão de metabólitos progestágenos/andrógenos apresentou diferença significativa ($p=0,002$) entre as fêmeas ($3,0 \pm 0,3$) e os machos ($1,3 \pm 0,2$). Aves com razão maior que 2 foram consideradas fêmeas, quando apresentaram razão menor que 2 foram considerados machos, atingindo 90% de acerto. O método de enzimoimunoensaio aqui descrito foi validado técnica e biologicamente, podendo ser usado em araras. A sexagem de araras pode ser feita por análise não invasiva dos metabólitos de progestágenos de excretas, utilizando-se a técnica de enzimoimunoensaio.

Palavras-chave: endocrinologia, aves, progesterona, testosterona, sexagem.

ABSTRACT

Macaws, like all Psittacids, catches the eye because of the beauty, color, charisma, and the ability to repeat words and songs. With the wild species research evolution, several data and new information on aspects such as behavior, reproduction, physiology start to appear. In these species, the collection of samples for hormonal monitoring has always been a challenge. Blood collections are difficult to perform because they often require physical restraint of the animal, which causes stress, or even sedation or anesthesia, which makes it difficult or impossible for frequent collections. Noninvasive hormonal dosage techniques came as a good option, performing the analysis of these hormones or their metabolites. These are excreted in the faeces, urine, excreta, hairs or saliva, allowing the accompaniment for long periods, since in many cases, do not require to manipulate the animal. The most commonly used samples are feces and urine, and in the case of birds, excreta. Most species of psittacids do not present sexual dimorphism, making it difficult to differentiate between males and females. Sexing techniques have been developed to facilitate and simplify, but commonly used blood samples require collection that can be dangerous and stressful for both the animal and the manipulator. Small blood samples collected by withdrawing a viable feather can be used, which requires restraint and causes pain and discomfort to the animal. The hormone dosage can be used successfully for sexing. In this work, excreta of 17 macaws (13 *Ara ararauna*, 3 *A. macao* and 1 *A. chloropterus*) were collected, with 10 males and 7 females, from the Municipal Zoo of Cascavel (Danilo Galafassi Municipal Park), three samples of each animal, during the month of February, 2018. All animals had their sexes previously defined by the Polymerase Chain Reaction. The enzyme-immunoassay technique was validated for progestogens and androgens for these three species of Brazilian macaws and, from this, a progestogen / androgen ratio was used for sexing. The ratio between the two steroids was used, as both are found in females and males and, the expected was a higher concentration of progestagens in females, and of higher androgens in males. Results are expressed as mean \pm standard error of the mean (SEM). The androgen concentration did not differ significantly ($p = 0.378$) between males (74.2 ± 5.6 pg/g) and females (66.0 ± 7.3 pg/g), but the progestagens concentration had a significant difference between the sexes (females = 204.7 ± 36.7 pg/g, males = 90.8 ± 9.4 pg/g, $p = 0.0012$). The ratio of progestogen/androgen metabolites presented a significant difference ($p = 0.002$) between females (3.0 ± 0.3) and males (1.3 ± 0.2). Birds with a ratio greater than 2 were considered females, when presented a ratio lower than 2 were considered males, reaching 90% of correctness. The enzyme immunoassay method described has been technically and biologically validated and can be used in macaws. Macaw's sex determination can be done by noninvasive analysis of excreta progestogen metabolites using the enzyme immunoassay technique.

Keywords: endocrinology, birds, progesteron, testosteron, sexing

LISTA DE FIGURAS

Capítulo 1:

Figura 1 - Arara-canindé (*Ara ararauna*)- Observa-se a distribuição de cores nas penas, bem como o bico negro e as listras de pequenas penas negras na face. Fonte: Karin Regina Gabriel, 2012.....19

Figura 2 - Arara-canga (*Ara macao*) - Observa-se a distribuição de cores com dorso vermelho, uma listra amarela na asa e as pontas azuis. Face branca nua e o bico em maioria branco. Fonte: Karin Regina Gabriel, 2012.20

Figura 3 - Arara-vermelha-grande (*Ara chloropterus*) - Na imagem à esquerda pode-se observar os detalhes das cores, a predominância do vermelho escuro, a listra verde na asa e as penas das pontas azuis. Na imagem à direita, o detalhe da face branca com pequenas penas vermelhas enfileiradas, e o bico em sua maioria branco. Fonte: Imagem esquerda: *Free Images* (<https://pt.freeimages.com>); direita: Karin Regina Gabriel, 2012.21

Figura 4: Arara-azul (*Anodorhynchus hyacinthinus*) Com coloração azul-cobalto bem distribuída, e a ponta preta de algumas penas nas asas, pescoço e cauda. Observa-se também as regiões nuas ao redor do olho e junto à maxila. Fonte: Karin Regina Gabriel, 2013.....22

Figura 5 - Esquema de liberação do hormônio liberador de gonadotropinas e seus subsequentes. O hormônio liberador de gonadotropinas é produzido por neurônios hipotalâmicos e é carregado para a hipófise anterior, sendo o gatilho para a secreção das gonadotropinas: LH e FSH. O tecido alvo primário das gonadotropinas são as gônadas. Entre outros efeitos, ocasiona nos ovários a liberação de estrógenos e progestágenos e, nos testículos a liberação de andrógenos. FONTE: MOYES & SCHULTE, 2014.....24

Capítulo 2:

Figura 1: Alterações em concentração de plasma de calopsitas após a injeção de agonista de GnRH, para a validação de ensaio enzimático para testosterona. Podemos observar a curva de excreção, e o pico que se deu em 60 minutos, seguido de um decréscimo. Fonte: Extraído e adaptado de Lovas et al, 2010.38

Figura 2: Curva de paralelismo. Dosagem das diluições seriadas (1:1 a 1:64) da solução padrão – concentração do hormônio conhecida (linha sólida) - e da amostra na qual os hormônios estão presentes (linha pontilhada). Ambas as curvas devem ser paralelas, mostrando que a dosagem obtida nas amostras é imunologicamente similar ao padrão. Fonte: Retirado e adaptado de Brown, 2008.38

Capítulo 3:

Figure 1: Androgen parallelism test. The objective of the test is to check if the dosage of the serial diluted pool of samples accompanies the standards serial dilution dosage. Solid line represents the standard concentration versus binding percentage. Dotted line represents the male's progestogen concentration and dashed line the female's concentration.53

Figure 2: Progestogen parallelism test. The objective of the test is to check if the dosage of the serial diluted pool of samples accompanies the standard serial dilution dosage. Solid line represents the standard concentration versus binding percentage.....54

Figure 3: Results for progestogens dosage over time, from female number 148, of the hormonal challenge with IM administration of a GnRH analogue. The line represents the unexpected result, after the administration a decrease happened, and after 24 hours of the administration, the concentration of progesterone started to increase again.55

Figure 4: Results over time for progestogens dosage, from female number 12 (*Ara ararauna*), of the hormonal challenge with IM administration of a GnRH analogue. The line represents the expected result, an increasing of progestogen metabolites (PEM), reaching a peak, and decreasing over time..... 55

Figure 5: Total concentrations of progestogens excreta metabolites (PEM) (ng/g of excreta; mean \pm SEM) in macaws' females and males. NOTE: a, b - differences between groups ($p=0.0012$)..... 57

Figure 6: Mean (\pm SEM) concentration (ng/g) of androgens excreta metabolites (AEM); in macaws' females and males. NOTE: no differences between groups ($p=0.378$).57

Figure 7: Ratio progestogens excreta metabolites (PEM)/androgens excreta metabolites (AEM) in macaw females and males. NOTE: a, b - differences between groups ($p=0.002$).59

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO GERAL	9
2 HIPÓTESE E PREDIÇÕES.....	12
3 FORMATO DA DISSERTAÇÃO.....	13
4 REFERÊNCIAS.....	14

CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE AS ESPÉCIES E A ENDOCRINOLOGIA REPRODUTIVA DAS ARARAS BRASILEIRAS (*Ara ararauna*, *Ara chloropterus*, *Ara macao*, *Anodorhynchus hyacinthinus*).....

INTRODUÇÃO	17
1.2 CARACTERÍSTICAS DAS ESPÉCIES.....	18
1.2.1 Arara-canindé (<i>Ara ararauna</i> , Linnaeus 1758)	18
1.2.2 Arara-canga (<i>Ara macao</i> , Linnaeus 1758).....	19
1.2.3 Arara-vermelha-grande (<i>Ara chloropterus</i> , Gray 1859)	20
1.2.4 Arara-azul (<i>Anodorhynchus hyacinthinus</i> , Latham, 1790)	21
1.3 BIOLOGIA REPRODUTIVA DAS ARARAS – ENDOCRINOLOGIA.....	22
1.4 EFEITOS DOS ESTEROIDES SEXUAIS NAS AVES	25
1.5 REFERÊNCIAS	26

CAPÍTULO 2 - DOSAGEM HORMONAL NÃO INVASIVA EM AVES – UMA REVISÃO (Capítulo formatado como artigo a ser submetido à Revista Brasileira de Reprodução Animal (RBRA), Belo Horizonte, MG, Brasil)

INTRODUÇÃO	30
AMOSTRAGEM NÃO INVASIVA	31
AMOSTRAS	33
EXTRAÇÃO.....	39
DOSAGEM HORMONAL	39
CONSIDERAÇÕES FINAIS	41
REFERÊNCIAS.....	42

CAPÍTULO 3 - SEX DETERMINATION IN BRAZILIAN MACAWS (*Ara ararauna*, *A. macao* And *A. chloropterus*) **BY ENZYMEIMMUNOASSAY OF SEX STEROIDS**

METABOLITES FROM EXCRETA (Capítulo formatado como artigo a ser submetido ao periódico <i>General and Comparative Endocrinology</i>)	45
ABSTRACT	45
INTRODUCTION	45
1 MATERIAL AND METHODS	46
1.1 SAMPLE COLLECTION	46
1.2 EXTRACTION	49
1.3 VALIDATION:	49
1.3.1 PARALLELISM	49
1.3.2 HORMONAL CHALLENGE	50
1.4 ENZYME IMMUNOASSAY	51
1.4.1 ANTIBODY	51
1.5 ASSAYS	52
1.6 DATA ANALYSIS	53
2 RESULTS	53
2.1 TECHNICAL AND BIOLOGICAL VALIDATION	53
2.1.1 PARALLELISM	53
2.1.2 HORMONAL CHALLENGE	55
2.2 SEXING OR SEX DETERMINATION	57
3 DISCUSSION	59
4 REFERENCES	63
 CONCLUSÃO GERAL	 61
REFERÊNCIA GERAL	67

1 INTRODUÇÃO GERAL

Dimorfismo, segundo o dicionário Michaelis (2019), tem o significado “qualidade do que existe em duas formas distintas”. O dimorfismo sexual pode ser definido como as diferenças fenotípicas entre machos e fêmeas, ou seja, as características externas como cores, formas e dimensões corporais, que são diferentes entre os machos e as fêmeas de uma mesma espécie (STRAUBE et al., 2010). Em relação ao grupo das aves, a maioria das espécies conhecidas não apresenta dimorfismo sexual (GRIFFITHS; PHIL, 2000).

A visualização de algum órgão sexual também não é viável em psitacídeos, sendo que a cloaca tem uma morfologia sexual em ambos os sexos. A cloaca é uma cavidade na qual os sistemas intestinal, urinário e genital finalizam. Isso caracteriza uma dificuldade quando falamos sobre tutores ou responsáveis por aves domesticadas como animal de estimação, desde o simples interesse em saber se sua ave é uma fêmea ou macho para nomeá-la de acordo, ou para o animal reproduzir (GRIFFITHS & PHIL, 2000).

Além disso, embora seja uma tarefa complicada, a definição do sexo das aves é essencial tanto para o manejo *in situ*, especialmente em programas de conservação de populações viáveis geneticamente em habitat natural (GUEDES, 2004), quanto para o manejo *ex situ*, quando se trata de projetos de reprodução e manutenção de indivíduos em cativeiro (MORINHA; CABRAL; BASTOS, 2012).

Com a criação das Instruções Normativas (IN) nº 117 e nº 118, em 1997, e mais tarde a IN nº 07/2015 pelo Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA), que normaliza a comercialização de animais por criadouros registrados junto ao IBAMA, o funcionamento de criadouros de animais da fauna silvestre brasileira com fins econômicos e industriais, e institui e

normatiza as categorias de uso e manejo da fauna silvestre em cativeiro, respectivamente, houve então, um crescimento da criação e comercialização legalizada de aves e outros animais silvestres no Brasil (ALLGAYER; CZIULIK, 2007). As instruções também tiveram como objetivo colaborar com a redução do comércio ilegal, já que agora existe a possibilidade da aquisição de aves silvestres de maneira lícita. Em 2011, a Lei Complementar Nº 140 veio para fixar regras de cooperação entre a União, os Estados, o Distrito Federal e os Municípios nas ações de gestão de fauna, flora, e proteção de ambas.

Concomitante com o crescimento dos criadouros registrados junto ao Ibama, a necessidade de sexagem dos animais também se tornou imprescindível.

Dentre as aves silvestres brasileiras mais admiráveis encontra-se o grupo das araras, pertencentes à ordem Psittaciformes, família Psittacidae. O interesse dos humanos por araras é secular, pela sua beleza, colorido, adaptabilidade ao cativeiro e a capacidade de imitar a voz humana. Essas aves foram consideravelmente traficadas e comercializadas ilegalmente para serem criadas como *pets* (GUEDES, 2004).

No Brasil, é reconhecido que existem seis espécies (SICK, 1997), sendo que a arara-azul-pequena (*Anodorhynchus glaucus*, Bonaparte, 1856) é considerada criticamente ameaçada pela Lista Vermelha de Espécies Ameaçadas da *International Union for Conservation of Nature* (IUCN, 2016), sem reconhecimento de nenhuma população em natureza ou cativeiro (PROJETO ARARA AZUL, 2009). A arara-azul-de-lear (*Anodorhynchus leari* Vieillot, 1816) tem um projeto dedicado à sua conservação, sua população é restrita a regiões no nordeste da Bahia, e é considerada em perigo de extinção pela IUCN (2017). Já a arara-azul-grande (*Anodorhynchus hyacinthinus* Latham, 1790) sofre muito com o tráfico, até 2013 era

considerada em risco de extinção, atualmente está listada como vulnerável pela Lista Vermelha de Espécies Ameaçadas (IUCN, 2016).

As espécies de araras que foram abordadas neste trabalho (*A. ararauna*, *A. macao* e *A. chloropterus*) são classificadas atualmente como “least concern” (LC – “pouco preocupantes”) pela IUCN, entretanto com o adendo de que caso o comércio ilegal não seja controlado, essa classificação pode ser alterada nos próximos anos (IUCN, 2018).

Existem algumas técnicas estabelecidas para a sexagem das aves, como as técnicas empíricas, as quais baseiam-se em visualizar as gônadas, como é o caso da determinação cirúrgica, por meio de laparotomia ou laparoscopia, ou até mesmo a visualização utilizando aparelhos como otoscópio ou artroscópio, por meio de uma pequena incisão na cavidade celomática. As técnicas que utilizam genes, das quais a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) é a mais utilizada, replicando os genes “W” e “Z”, dos quais, fêmeas possuem ambos, e machos possuem somente o “Z” (GRIFFITHS; PHIL, 2000).

Em 2006, Dias e Oliveira realizaram a determinação do sexo em pequenos psitacídeos, por meio da dosagem de metabólitos de esteroides sexuais a partir de excretas, pela técnica de radioimunoensaio. Essa técnica torna-se interessante pelo fato de que, quando falamos sobre animais silvestres, enfrentamos uma dificuldade na obtenção de amostras biológicas, em especial se os animais são de vida livre. Desta forma, as técnicas de análises não invasivas para aves vêm ganhando espaço e estão sendo cada vez mais valorizadas; uma vez que a contenção causa estresse, independente se for rápida ou não, além dos riscos ao manipulador e à própria ave (DIAS, 2003).

As excretas das aves contêm várias informações sobre o organismo e seu metabolismo. Comparadas ao sangue, que é a amostra de escolha na maioria dos ensaios e exames, as excretas podem ser obtidas de forma não invasiva, coletas

diretamente do piso do recinto, o que não introduz outras variáveis ligadas à contenção do animal que podem alterar resultados. Ainda, podem ser aplicadas em estudos de longo prazo, que exigem várias coletas sequenciais. As excretas são amostras biológicas que se apresentam como bom substituto para amostras de plasma, soro, saliva, lágrima, etc. para pesquisas com animais que se estressam fácil, ou de pequeno tamanho (PUKAZHENTHI; WILDT, 2004; SCHWARZENBERGER, 2007).

Sendo assim, esse estudo teve como principal objetivo avaliar se a sexagem de araras também pode ser também determinada pela quantificação de metabólitos de esteroides uofecais, como ocorre em pequenos psitacídeos.

2 HIPÓTESE E PREDIÇÕES

Considerando as informações dos capítulos 1. Endocrinologia reprodutiva das araras brasileiras (*Ara ararauna*, *Ara chloropterus*, *Ara macao*, *Anodorhynchus hyacinthinus*); e 2. Dosagem hormonal não invasiva em aves - Uma revisão; a principal hipótese a ser testada pelo presente trabalho é:

H1: é possível realizar a sexagem de araras por meio da quantificação de metabólitos uofecais de esteroides sexuais (MUE), mais especificamente metabólitos uofecais de progestágenos (MUP) e androgênios (MUA).

Se H1 for aceito, espera-se encontrar diferenças nas concentrações totais de MUP e MUA entre machos e fêmeas de araras. Além disso, espera-se encontrar qual (ou quais), entre os metabólitos avaliados, é (ou são) o(s) melhor(es) indicador(es) de sexagem ou se existe alguma relação (taxa) entre parâmetros que possa ser utilizada como melhor “preditora” do sexo do animal.

3 FORMATO DA DISSERTAÇÃO

A dissertação está dividida em três capítulos, dos quais dois estão em formato de artigos publicáveis:

Cap. 1: Endocrinologia reprodutiva das araras brasileiras (*Ara ararauna*, *Ara chloropterus*, *Ara macao*, *Anodorhynchus hyacinthinus*).

Cap. 2: Dosagem hormonal não invasiva em aves - Uma revisão (Capítulo adaptado como artigo publicável para submissão à Revista Brasileira de Reprodução Animal, Belo Horizonte, MG, Brasil).

Cap. 3: Sex determination in Brazilian macaws (*Ara ararauna*, *A. macao* e *A. chloropterus*) by enzymeimmunoassay of sex steroids metabolites from excreta (Capítulo adaptado como artigo publicável para submissão à Revista *General and Comparative Endocrinology*, Elsevier).

4 REFERÊNCIAS

- BIRDLIFE INTERNATIONAL (2018). *Ara ararauna*. **The IUCN Red List of Threatened Species** (2018): <http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2018-2.RLTS.T22685539A131917270.en>. Acesso em 11 de fevereiro de 2019.
- BIRDLIFE INTERNATIONAL (2016). *Anodorhynchus glaucus*. **The IUCN Red List of Threatened Species**. <http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2016-3.RLTS.T22685527A93078084.en>. Downloaded on 11 February 2019.
- BIRDLIFE INTERNATIONAL (2017). *Anodorhynchus leari* (amended version of 2016 assessment). **The IUCN Red List of Threatened Species**. <http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2017-3.RLTS.T22685521A119259023.en>. Downloaded on 11 February 2019.
- ALLGAYER, M. A. C.; CZIULIK, M. (2007) Reprodução de psitacídeos em cativeiro. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 31, n. 3, p. 344–350.
- ANTUNES, E.; OLIVEIRA, C. A. (2006) Determinação do sexo de psitacídeos por radioimunoensaio (RIE) de esteróides sexuais a partir de excretas cloacais. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 43, p. 5–11.
- GRIFFITHS, R.; PHIL, D. (2000) Sex identification in birds. **Seminars in Avian and Exotic Pet Medicine**, v. 9, n. 1, p. 14–26.
- GUEDES, N. M. R. (2004) Management and conservation of the large macaws in the wild. **Ornitologia Neotropical**, v. 15, p. 279-283.
- MICHAELIS. **Moderno Dicionário da Língua Portuguesa**. Disponível em: <<https://michaelis.uol.com.br/moderno-portugues/busca/portugues-brasileiro/dimorfismo/>>. Acesso em: 22 jan. 2019.
- MORINHA, F.; CABRAL, J. A.; BASTOS, E. (2012) Molecular sexing of birds: A comparative review of polymerase chain reaction (PCR)-based methods.
- PROJETO ARARA AZUL. **Arara-azul-pequena**. Disponível em: <<http://www.projetoararaazul.org.br/arara/Home/AAraraAzul/Asararasazuis/Araraazul-pequena/tabid/297/Default.aspx>>. Acesso em: 29 maio. 2018.
- PUKAZHENTHI, B. S.; WILDT, D. E. (2004) Which reproductive technologies are most relevant to studying, managing and conserving wildlife? **Reproduction, Fertility and Development**, v. 16, n. 2, p. 33.
- SCHWARZENBERGER, F. (2007) The many uses of non-invasive faecal steroid monitoring in zoo and wildlife species. **International Zoo Yearbook**, v. 41, n. 1, p. 52–74.
- SICK, H (1997) . Ornitologia Brasileira. Nova Front ed. Rio de Janeiro
- STRAUBE, F. C.; Bráz Guimarães Junior, A.; Vieira-Da-Rocha, M. C.; Pioli, D. (2010) **Glossário Brasileiro de Birdwatching**. Curitiba.

UNEP-WCMC (Comps.) (2018). **The checklist of cites species website. CITES secretariat, Geneva, Switzerland.** Compiled by UNEP-WCMC, Cambridge, UK. Disponível em: <http://checklist.cites.org>. Acesso em 14 de maio de 2018.

CAPÍTULO 1

1 CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE AS ESPÉCIES E A ENDOCRINOLOGIA REPRODUTIVA DAS ARARAS BRASILEIRAS (*Ara ararauna*, *Ara chloropterus*, *Ara macao*, *Anodorhynchus hyacinthinus*).

Resumo: As araras, como todos os psitacídeos, chamam atenção pela beleza, cores, carisma e pela habilidade de repetir palavras e canções. Sofreram e ainda sofrem com o tráfico ilegal e perda de habitat. Existem vários projetos dedicados à conservação das espécies de araras brasileiras que ainda não entraram em extinção. Junto com esses projetos surgem vários dados e novas informações sobre vários aspectos como comportamento, reprodução e fisiologia. Além de dados gerais sobre as espécies, essa revisão tem objetivo de organizar informações sobre a endocrinologia reprodutiva das grandes araras brasileiras: arara-canindé *Ara ararauna*, arara-vermelha-grande *Ara chloropterus*, arara-canga *Ara macao* e arara-azul *Anodorhynchus hyacinthinus*, contribuindo para a compreensão da fisiologia reprodutiva dessas aves e, dessa forma, com os trabalhos para conservação *ex situ* e *in situ* destas espécies.

1.1 INTRODUÇÃO

Na história da humanidade, as aves sempre tiveram um grande significado, seja ele cultural, artístico, econômico ou filosófico. A paixão e admiração humana pelas aves continua crescendo pelos milênios (*BIRDLIFE INTERNATIONAL*, 2018). A sociabilidade, inteligência, as cores e a capacidade de imitar sons fazem com que os Psittaciformes sejam os mais procurados como aves de estimação (GRESPLAN e RASO, 2014; SICK, 2007). Por esse motivo, e pela conscientização da população interessada, o mercado legalizado de animais de companhia não convencionais está crescendo e se especializando.

Os psitacídeos estão distribuídos globalmente, desde áreas frias como a Patagônia até áreas subtropicais. Constituem uma família muito antiga, com fósseis de até 25 milhões de anos, sendo o Brasil o país mais bem representado no mundo em espécies de psitacídeos, chamado em meados de 1500 de “Terra dos papagaios” (SICK, 1997).

Os membros brasileiros dessa ordem apresentam uma morfologia muito característica, com bico alto e curvado e maxila com grande mobilidade, o que traz uma grande potência ao bico. Geralmente possuem papo grande, asas também grandes e fortes, e contam com uma visão muito apurada graças a duas fóveas na retina para o foco. Apresentam odor característico que lembra cheiro de mel (SICK, 1997).

Os sexos geralmente são parecidos, não há dimorfismo sexual pronunciado na maioria das espécies de psitacídeos - segundo observado no guia de Forshaw (2010) "*Parrots of the world*" (Papagaios do mundo, em livre tradução) e no livro Ornitologia Brasileira (SICK, 1997), poucas são as espécies que apresentam dimorfismo sexual. A definição do sexo das aves que não apresentam dimorfismo pode ser importante, desde uma mera curiosidade de um proprietário que gostaria de saber se sua ave de estimação trata-se de uma fêmea ou um macho (GRIFFITHS, 2000) (machos são reconhecidos como mais falantes entre os criadores (SICK, 1997) até para modernas pesquisas envolvendo comportamento, estudos para otimizar a reprodução destes animais em cativeiro ou a sua viabilidade genética em um bando na natureza.

1.2 CARACTERÍSTICAS DAS ESPÉCIES

Segundo Sick (1997), são reconhecidas seis espécies de araras verdadeiras para o Brasil: *Ara ararauna*, *Ara macao*, *Ara chloropterus*, *Anodorhynchus hyacinthinus*, *Anodorhynchus leari* e *Anodorhynchus glaucus*.

A arara-azul-pequena (*Anodorhynchus glaucus*, Bonaparte, 1856) é considerada criticamente ameaçada pela Lista Vermelha de Espécies Ameaçadas (IUCN, 2016) porém, de acordo com dados do Projeto Arara Azul (2009), é considerada extinta, pois não há populações conhecidas em natureza ou cativeiro. A arara-azul-de-Lear (*Anodorhynchus leari* Vieillot, 1816) tem um projeto dedicado à sua conservação, sua população é restrita a regiões no nordeste da Bahia, e é considerada em perigo de extinção pela IUCN (2017).

1.2.1 Arara-canindé (*Ara ararauna*, Linnaeus 1758)

De dorso azul e ventre amarelo, a arara-canindé tem o tamanho aproximado de 80 centímetros, do topo da cabeça à ponta da cauda, apresenta pequenas penas pretas na região da face, algumas penas verdes acima do nariz, e o bico geralmente também é de coloração preta SICK (1997) (Figura 1).

FIGURA 1 - ARARA-CANINDÉ (*Ara ararauna*)



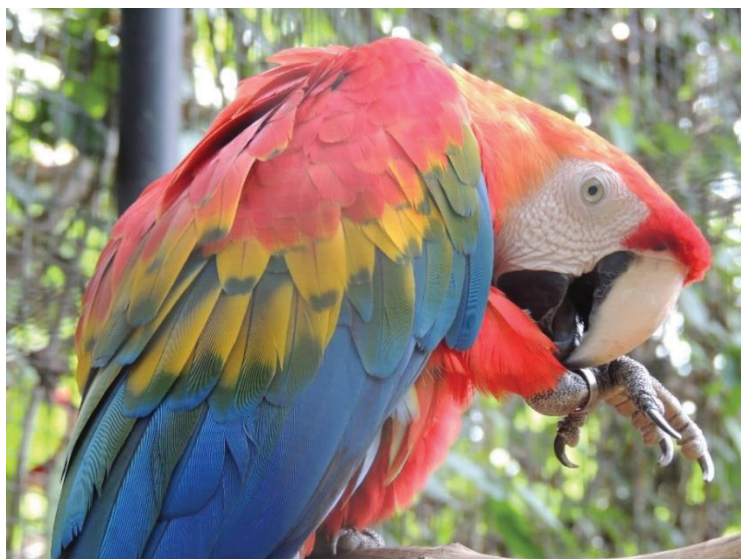
LEGENDA - Observa-se a distribuição de cores nas penas, bem como o bico negro e as listras de pequenas penas negras na face.

FONTE - Karin Regina Gabriel, 2012.

Classificada na Lista Vermelha de Espécies Ameaçadas (IUCN, 2018) como “pouco preocupante”, a própria publicação da lista traz a informação que as populações vêm diminuindo. Sempre sofreu muito com o tráfico, e desde 1981 é listada no Apêndice II da lista da Convenção sobre Comércio Internacional das Espécies da Flora e Fauna Selvagens em Perigo de Extinção (CITES) UNEP-WCMC (2018): não se encontra em risco de extinção, mas logo pode estar, caso o comércio não seja controlado.

1.2.2 Arara-canga (*Ara macao*, Linnaeus 1758)

Possui aproximados 85 centímetros de tamanho (topo da cabeça à ponta de cauda), corpo vermelho com uma listra amarela em cada asa e tonalidade azul nas pontas das penas das asas e cauda. Face nua branca e bico em sua maioria branco (SICK, 1997; FORSHAW, 2010) (Figura 2).

FIGURA 2 - ARARA-CANGA (*Ara macao*)

LEGENDA – Observa-se a distribuição de cores com dorso vermelho, uma listra amarela na asa e as pontas azuis. Face branca nua e o bico em maioria branco.

FONTE - Karin Regina Gabriel, 2012.

Assim como a *A. ararauna*, também é considerada como “pouco preocupante” pela Lista Vermelha de Espécies Ameaçadas (IUCN, 2018), e também consta a informação que a população vem diminuindo. Já na lista da Convenção sobre o Comércio Internacional das Espécies da Flora e Fauna Selvagens em Perigo de Extinção (CITES), ela se encontra no Apêndice I desde 1985, o qual considera que a espécie se encontra em extinção e seu comércio é proibido UNEP-WCMC (2018).

1.2.3 Arara-vermelha-grande (*Ara chloropterus*, Gray 1859)

De coloração vermelha mais escura do que a *A. macao*, tem tamanho aproximado de 90 centímetros, do topo da cabeça à ponta da cauda. Asas de voo, dorso e algumas asas da cauda em azul, com uma listra verde no centro de cada asa. Face nua branca, com linhas formadas por pequenas penas vermelhas (Forshaw, 2010; Figura 3).

FIGURA 3 - ARARA-VERMELHA-GRANDE (*Ara Chloropterus*)

LEGENDA - Na imagem à esquerda pode-se observar os detalhes das cores, a predominância do vermelho escuro, a listra verde na asa e as penas das pontas azuis. Na imagem à direita, o detalhe da face branca com pequenas penas vermelhas enfileiradas, e o bico em sua maioria branco.

FONTE - Imagem esquerda: *Free Images* (<https://pt.freeimages.com>); direita: Karin Regina Gabriel, 2012.

Bem como as outras espécies citadas, é considerada “pouco preocupante” na Lista Vermelha de Espécies Ameaçadas (IUCN, 2018), e está listada no Apêndice II da lista CITES, afirmando que não está em extinção, mas caso o comércio não seja controlado, pode mudar a categoria da espécie.

1.2.4 Arara-azul (*Anodorhynchus hyacinthinus*, Latham, 1790)

De coloração azul cobalto intensa, majestosamente inconfundível, pode chegar a 100 cm de comprimento do topo da cabeça à ponta da cauda. Bico grande negro, possui áreas ao redor do olho e na base da mandíbula nuas e amarelas.

A espécie sofre muito com o tráfico, até 2013 era considerada em risco de extinção, atualmente está listada como vulnerável pela Lista Vermelha de Espécies Ameaçadas (IUCN, 2016). E na lista CITES, a espécie encontra-se no Apêndice I desde 1987, proibindo o seu comércio internacional.

FIGURA 4: ARARA-AZUL (*Anodorhynchus hyacinthinus*).



LEGENDA - Com coloração azul-cobalto bem distribuída, e a ponta preta de algumas penas nas asas, pescoço e cauda. Observa-se também as regiões nuas ao redor do olho e junto à maxila.

FONTE - Karin Regina Gabriel, 2013.

1.3 BIOLOGIA REPRODUTIVA DAS ARARAS – ENDOCRINOLOGIA

Durante o desenvolvimento embrionário, surgem como características sexuais primárias as gônadas (MOYES & SCHULTE, 2014). Diferente da maioria dos mamíferos, os testículos das aves permanecem na cavidade corpórea (JOHNSON, 2017; NORRIS, 2007). Já nas fêmeas, na maioria das espécies, somente o ovário esquerdo se desenvolve (CHESTER-JONES; INGELTON & PHILLIPS, 1987; BENTLEY *et al.*, 2007; LOVETTE & FITZPATRICK, 2016; JOHNSON, 2017; MOYES & SCHULTE, 2014).

Apesar dos testículos serem internos à cavidade celômica, testes demonstraram que a espermatogênese está adaptada à temperatura corporal das aves (cerca de 41°C). Em um teste com criação de um escroto artificial, a espermatogênese foi interrompida quando os testículos foram expostos a uma temperatura mais baixa, bem como quando testículos foram aquecidos em soro fisiológico morno (JOHNSON, 2017).

Quanto à fêmea, existe uma grande assimetria entre as gônadas e, segundo Fontenele-Neto e colaboradores (2012), e Johnson (2017), isso acontece pela ação do hormônio anti-Mülleriano (HAM) e do estrógeno. O HAM é produzido tanto em fêmeas quanto em machos durante o desenvolvimento gonadal, e tem como função causar a regressão dos ductos de Müller, os quais formam os ovidutos - ductos acessórios da gônada do sexo feminino. Na ave fêmea, a secreção de estrogênio pelo ovário esquerdo é maior que o direito, o que causa uma inibição na ação do HAM, e a gônada fica preservada deste lado do animal.

Como em outros vertebrados, o sistema endócrino das aves é composto por tecidos e órgãos que produzem substâncias químicas, os hormônios, que são transportados pela corrente sanguínea e agem em tecidos-alvo. O controle da produção dos hormônios é geralmente feito por outros hormônios, que são produzidos na glândula hipófise, estes que por sua vez têm sua produção controlada pelo hipotálamo. Com isso, há uma formação dos eixos de três níveis: hipotálamo, hipófise, glândulas endócrinas periféricas (adrenal ou gônadas) (MC WILLIAMS *et al.*, 2016).

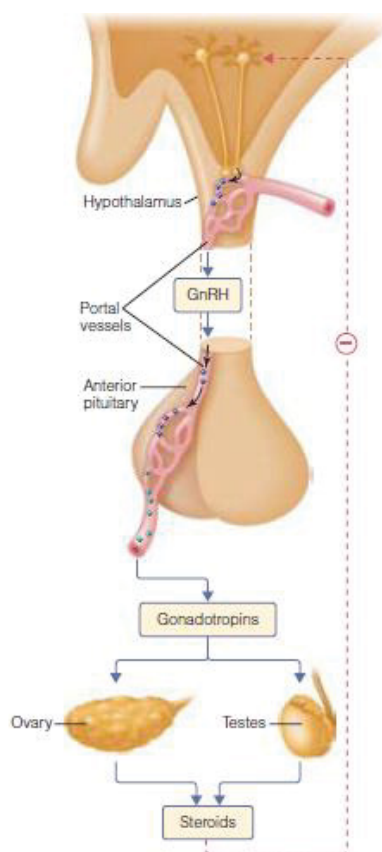
Grande parte dos hormônios produzidos na glândula adrenal e nas gônadas provém do colesterol, por isso são chamados de esteroides (BENTLEY *et al.*, 2006; MOYES & SCHULTE, 2014; MC WILLIAMS *et al.*, 2016). Os esteroides produzidos na adrenal são os corticosteroides, incluindo a aldosterona, que tem papel na regulação do sódio no organismo das aves, e também a corticosterona, que está ligada à resposta ao estresse (Norris 2007). Já nas gônadas, são produzidos os esteroides sexuais, incluindo andrógenos como a testosterona; os estrógenos como o estradiol; e os progestágenos como a progesterona (KIME, 1987; MOYES & SCHULTE, 2014; NORRIS, 2007).

Apesar dos andrógenos e estrógenos estarem relacionados com características masculinas e femininas, respectivamente, ambos os sexos produzem e têm funções para as duas classes de hormônios (MC WILLIAMS *et al.*, 2016; MOYES & SCHULTE, 2014; NORRIS, 2007). Segundo Johnson (2017), as fêmeas necessitam de pouca quantidade de andrógenos para manter a densidade óssea, massa muscular e expressar comportamento reprodutivo; já nos machos, a função principal do estrogênio nos ductos eferentes do testículo, onde o hormônio ajuda na reabsorção de líquido dos túbulos seminíferos.

Ainda existem outras categorias de hormônios que não se encaixam em esteroides. Por exemplo, os hormônios como a adrenalina, produzida pela medula adrenal, é uma catecolamina; a insulina, produzida no pâncreas, e a prolactina, são polipeptídios; e os hormônios hipotalâmicos são peptídeos (MC WILLIAMS *et al.*, 2016).

A síntese dos esteroides nas gônadas é controlada por hormônios produzidos pela glândula hipófise, na porção anterior, chamados de gonadotropinas. As gonadotropinas são glicoproteínas diméricas comuns à maioria dos vertebrados, o hormônio folículo estimulante (FSH) e o hormônio luteinizante (LH) (JOHNSON, 2017; MOYES & SCHULTE, 2014). E a liberação das gonadotropinas é controlada, principalmente, pela liberação de um hormônio hipotalâmico, o hormônio liberador de gonadotropinas (GnRH) (MOYES & SCHULTE, 2014) (Figura 5).

FIGURA 5 - ESQUEMA DE LIBERAÇÃO DO HORMÔNIO LIBERADOR DE GONADOTROPINAS E SEUS SUBSEQUENTES



LEGENDA - O hormônio liberador de gonadotropinas é produzido por neurônios hipotalâmicos e é carregado para a hipófise anterior, sendo o gatilho para a secreção das gonadotropinas: LH e FSH. O tecido alvo primário das gonadotropinas são as gônadas. Entre outros efeitos, ocasiona nos ovários a liberação de estrógenos e progestágenos, e nos testículos a liberação de andrógenos.

FONTE - MOYES & SCHULTE, 2014

Nas aves, os esteroides sexuais podem ser sintetizados em quaisquer tecidos que contenham as enzimas necessárias. Ou seja, pode haver síntese de esteroides no cérebro diretamente do colesterol, e a transformação de testosterona provinda da circulação em estrógenos. A influência dos hormônios no comportamento das aves e no funcionamento do cérebro vem sendo reconhecida, e os esteroides produzidos no cérebro são elementos importantes nessa influência (MC WILLIAMS *et al.*, 2016). Os hormônios da reprodução estão relacionados ao desenvolvimento, maturação sexual, gametogênese e acasalamento (MOYES & SCHULTE, 2014).

1.4 EFEITOS DOS ESTEROIDES SEXUAIS NAS AVES

Grande parte dos estudos endócrinos nas aves foram feitos em aves domésticas, como perus, galinhas e patos (KIME, 1987; NORRIS, 2007). Podem existir algumas diferenças entre aves que apresentam sazonalidade, mas algumas características parecem ser comuns à maioria das espécies, como a produção do estradiol pelo folículo ovariano que está em crescimento. A quantidade de estradiol aumenta junto com o crescimento do folículo. A presença de hierarquia de folículos na galinha e no peru, fazendo com que sempre haja folículos em todos os estágios no ovário, causa pequenas flutuações na concentração plasmática de estrogênio (KIME, 1987).

Os hormônios andrógenos são responsáveis pelos efeitos “masculinizantes”. Nos machos, a fonte primária de andrógenos é o testículo, e um dos principais andrógenos é a testosterona. A sua produção no testículo é estimulada pelo hormônio luteinizante (LH) vindo da glândula hipófise, que então libera na corrente sanguínea. Nas fêmeas, a produção de andrógenos é feita no córtex adrenal e nos ovários. Ainda existem outros andrógenos importantes como a di-hidrotestosterona (DHT), androstenediona e a dehidroepiandrosterona (DHEA). Os andrógenos também estão associados a efeitos nas características sexuais secundárias em ambos os sexos, por exemplo, em várias espécies de aves a época reprodutiva é acompanhada por uma troca de cor no bico do macho, e na plumagem em ambos os sexos (NORRIS, 2007).

Já os estrógenos são responsáveis pelos efeitos “feminilizantes”, mas assim como os andrógenos, são produzidos e têm efeitos importantes em ambos os sexos (MOYES & SCHULTE, 2014; NORRIS, 2007). O estradiol, um dos principais

estrógenos, é produzido nos ovários a partir da conversão de andrógenos pela enzima aromatase. A produção da aromatase é estimulada pelo hormônio folículo estimulante (FSH) produzido na hipófise. Outros estrógenos importantes são a estrona e o estriol (NORRIS, 2007). Nas aves, a secreção de estrógenos pelas células foliculares leva o fígado a produzir altas quantidades de vitelogeninas (NORRIS, 2007), que são proteínas envolvidas no processo de vitelogênese: formação do vitelo, a fonte de nutrição ao embrião, que no caso das aves é uma mistura complexa de proteínas e lipídios, a gema (MOYES & SCHULTE, 2009; NORRIS, 2007). Além da vitelogênese, as vitelogeninas também são proteínas ligantes de cálcio, o que resulta na concentração de cálcio nos ovidutos, que será utilizado para formação da casca do ovo (NORRIS, 2007).

Os progestágenos, por sua vez, têm grande importância na manutenção da condição secretória do endométrio durante a fase luteal do ciclo ovariano. Já nas aves, não existe um corpo lúteo persistente após a ovulação, sendo que essa é uma característica de animais vivíparos. Os folículos colapsados após a ovulação consistem em uma grande quantidade de células da granulosa contendo progesterona, que por sua vez auxilia na deposição da proteína avidina, principal na clara, durante a formação do ovo. A progesterona é um dos progestágenos mais abundantes, mas ainda existem a pregnenolona, 17 α -hidroxipregnenolona e 17 α -hidroxiprogesterona. São produzidas no córtex adrenal, nas gônadas, e no tecido adiposo em fêmeas, e são intermediários da síntese da maioria dos outros hormônios esteroides (NORRIS, 2007).

1.5 REFERÊNCIAS

BENTLEY, G. E.; TSUTSUI, K.; WINGFIELD, J. C. (2007) Endocrinology of reproduction. In: JAMIESON, B. G. M. **Reproductive biology and phylogeny of birds – Part A**. Enfield: Science Publishers, cap. 5, p. 181-242.

BIRDLIFE. **State of the world's birds** (2018). Disponível em: https://www.birdlife.org/sites/default/files/attachments/bl_reporteng_v11_spreads.pdf. Acesso em: 11 maio. 2018

BIRDLIFE INTERNATIONAL (2019) *Ara macao*. **The IUCN Red List of Threatened Species 2016**: e.T22685563A93079992. <http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2016-3.RLTS.T22685563A93079992.en>. Acessado em 14 de maio de 2018.

BIRDLIFE INTERNATIONAL (2018). *Ara ararauna*. **The IUCN Red List of Threatened Species**. e.T22685539A131917270. <http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2018-2.RLTS.T22685539A131917270.en>. Downloaded on 11 February 2019.

BIRDLIFE INTERNATIONAL (2016). *Anodorhynchus glaucus*. **The IUCN Red List of Threatened Species 2016**: e.T22685527A93078084. <http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2016-3.RLTS.T22685527A93078084.en>. Downloaded on 11 February 2019.

BIRDLIFE INTERNATIONAL (2017). *Anodorhynchus leari* (amended version of 2016 assessment). **The IUCN Red List of Threatened Species**: e.T22685521A119259023. <http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2017-3.RLTS.T22685521A119259023.en>. Downloaded on 11 February 2019.

BIRDLIFE INTERNATIONAL (2016) *Ara chloropterus*. **The IUCN Red List of Threatened Species**. <http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2016-3.RLTS.T22685566A93080287.en>. Acessado em 14 de maio de 2018.

BIRDLIFE INTERNATIONAL (2016) *Anodorhynchus hyacinthinus*. **The IUCN Red List of Threatened Species**. <http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2016-3.RLTS.T22685516A93077457.en>. Acessado em 28 de maio de 2018.

CHESTER-JONES, I.; INGLETON, P. M.; PHILLIPS, J.G. (ed.) (1987). **Fundamentals of comparative vertebrate endocrinology**. Springer Science & Business Media, Plenum press.

FONTENELE-NETO, J. D. (2012) Morfofisiologia da reprodução das aves: desenvolvimento embrionário, anatomia e histologia do sistema reprodutor. **Acta Veterinaria Brasilica**, v. 6, n. 3, p. 165–176.

FORSHAW, J. M. (2010) **Parrots of the world**. Princeton University Press.

GRESPLAN, A.; RASO, T. F. Psittaciformes (Araras, Papagaios, Periquitos, Calopsitas e Cacatuas). In: CUBAS, Z. S., SILVA, J. C. R.; CATÃO-DIAS, J. L. (2014) **Tratado de Animais Selvagens: Medicina Veterinária**. São Paulo: Roca

GRIFFITHS, R. (2000) Sex identification in birds. **Seminars in avian and exotic pet medicine**, v. 9, n. 1, p. 14–26.

JAMIESON, B. G. M. (2007) **Reproductive biology and phylogeny of birds**. Science Publishers.

KIME, D. E. The Steroids. (1987) **Fundamentals of Comparative Vertebrate Endocrinology**. p.3–56, 1987. Boston, MA: Springer US.

LOVETTE, I. J.; FITZPATRICK, J. W (2016). **Handbook of Bird Biology**. Wiley.

MCWILLIAMS, S.; ADKINS-REGAN, E.; VLECK, C. (2016) Bird Physiology. *In*: Cornell University Laboratory of Ornithology: **Handbook of Bird Biology**. John Wiley & Sons. 3ed. p 215-262.

MOYES, C. D.; SCHULTE, P. M. (2014) **Principles of animal physiology**. 2º ed.

NORRIS, D. O. (2007) **Vertebrate endocrinology**. 4º ed. Elsevier Academic Press.

PROJETO ARARA AZUL. **Arara-azul-pequena**. Disponível em: <<http://www.projetoararaazul.org.br/arara/Home/AAraraAzul/Asararasazuiz/Araraazul-pequena/tabid/297/Default.aspx>>. Acesso em 29 de maio de 2018.

REECE, W. O.; ERICKSON, H. H.; GOFF, J. P.; UEMURA, E. E. (2017) **Dukes' physiology of domestic animals**. 13º ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.

SCANES, C. G. (2015) **Sturkie's Avian Physiology**. 6º ed. Elsevier

SICK, H (1997) . **Ornitologia Brasileira**. Nova Front ed. Rio de Janeiro

UNEP-WCMC (Comps.) (2018). **The checklist of cites species website. CITES secretariat, Geneva, Switzerland**. Compiled by UNEP-WCMC, Cambridge, UK. Disponível em: <http://checklist.cites.org>. acesso em 14 de maio de 2018.

CAPÍTULO 2

Monitoramento hormonal não invasivo em aves – uma revisão*Non-invasive hormonal monitoring in birds – a review***Bruna Todeschini Vieira, Nei Moreira¹**

Universidade Federal do Paraná, Programa de Pós-Graduação em Zoologia, PR, Brasil

¹Correspondência para neimoreira@ufpr.br

Resumo: Para espécies silvestres, a coleta de amostras para monitorar o estresse e a função reprodutiva sempre foi um desafio. Coletas de sangue em animais silvestres são difíceis de serem realizadas, pois muitas vezes exigem a contenção física do animal, que causa estresse, ou até uma sedação ou anestesia, que acaba dificultando ou impossibilitando coletas muito frequentes. As técnicas de dosagens hormonais não invasivas vieram como uma boa opção, realizando a análise destes hormônios ou seus metabólitos. Estes são excretados nas fezes, urina, excretas, pelos ou saliva, permitindo o acompanhamento por longos períodos, pois em muitos casos, não exigem manipular o animal. As amostras mais utilizadas são fezes e urina e, no caso das aves, excretas. As técnicas mais utilizadas são os ensaios imunológicos, utilizando isótopos radioativos (radioimunoensaio) ou enzimas (enzimoimunoensaio). Nesta revisão, são apresentadas as principais vantagens da dosagem não invasiva, focando mais seu uso em aves, utilizando excretas e abordando também as principais técnicas de dosagem.

Palavras-chave: Endocrinologia, excretas, radioimunoensaio, enzimoimunoensaio.

Abstract: For wild species, sampling for monitoring stress and reproductive function has always been a challenge. Blood collections in wild animals are difficult to perform because they often require physical restraint of the animal, which causes stress, or at least sedation or anesthesia, which makes it difficult or impossible for frequent collections. Noninvasive hormone monitoring techniques came as a good option, performing analysis of these hormones or their metabolites. These are excreted in feces, urine, excreta, hair or saliva, allowing the collection for long periods, since in many cases they do not require to manipulate the animal. The most commonly used samples are feces and urine, and in the case of birds, excreta. The most commonly used techniques are immunological assays, radioactive isotopes (radioimmunoassay) or enzymes (enzymeimmunoassay). In this review, the main advantages of noninvasive hormonal monitoring are presented, focusing more on their use in birds, using excreta and also addressing the main dosage techniques.

Keywords: endocrinology, excreta, radioimmunoassay, enzymeimmunoassay.

Introdução

Análises hormonais já são consideradas métodos precisos para monitorar a função reprodutiva e o estresse em várias espécies, mas exigem um conhecimento básico da fisiologia da espécie em questão, como o metabolismo hormonal e formas de secreção e

excreção (Hodges et al, 2010), principalmente quando a dosagem será realizada por metabólitos hormonais.

Alguns dos problemas enfrentados pela análise hormonal em soro ou plasma, que exigem a coleta de sangue, envolvem, no caso de animais de vida livre, a logística para se fazer as coletas, além da quantidade de sangue para realizar o ensaio. Em passeriformes, por exemplo, a quantidade que pode ser coletada de sangue é muito pequena, proporcional ao pequeno tamanho. E como a amostra sanguínea representa um valor pontual do hormônio – como estava naquele momento da coleta – pode ser que uma coleta apenas não seja suficiente. Já nas fezes, obtemos um *pool* dos hormônios excretados, o que pode melhor representar os resultados (Goymann, 2005).

As dosagens podem ser realizadas, em geral, a partir de várias amostras biológicas, como: urina, saliva, soro, sangue, pelos e fezes, sendo que urina e fezes já estão bem estabelecidas para o monitoramento de esteroides em várias espécies (Brown, 2008).

Nas aves, o termo excreta é utilizado, pois não há separação entre fezes e urina. As coletas não interferem muito no comportamento normal do animal, permitindo que sejam realizadas várias coletas do mesmo indivíduo (Goymann, 2005). A vantagem de utilizar as excretas para dosar hormônios é determinar a função gonadal sem precisar tocar o animal, pois a amostra pode ser coletada no chão do recinto e levada ao laboratório (Pukazhenthil e Wildt, 2004).

Amostragem não invasiva

As técnicas de monitoramento hormonal não invasivo devem ser estudadas com dedicação, pois diminuem riscos para o animal e para a coleta, sem interferir com o comportamento natural (Buchanan e Goldsmith, 2004; Goymann, 2012). E ainda assim, permitem a visualização de um panorama de hormônios (e até outros metabólitos) sem causar

estresse, apresentando um resultado fiel (Goymann, 2012; Palme, 2005; Schwarzenberger, 2007; Wasser et al., 2000).

As primeiras informações obtidas nas análises hormonais foram de espécies de mamíferos domésticos, e ajudaram a delinear: Função gonadal com base no sexo, idade; sazonalidade; tempo da espermatogênese e ovulação; tipo de ovulação (espontânea ou induzida); formas de superar a infertilidade; definir protocolos de reprodução assistida (Pukazhenthí e Wildt, 2004).

Com os avanços na anestesia em animais silvestres, especialmente mamíferos, em meados dos anos setenta, amostras sanguíneas começaram a ser coletadas, porém não poderiam ser realizadas com frequência, inviabilizando as coletas sequenciais por longos períodos. Junto com isso, algumas evidências de alterações hormonais causadas pela anestesia começaram a surgir, fazendo necessária a busca por uma alternativa (Pukazhenthí e Wildt, 2004).

Sobre o estresse, de acordo com o trabalho desenvolvido por Gratto-Trevor e colaboradores, em 1991, é necessário levar em conta que a captura, o manejo do animal e a coleta em si podem causar um episódio de estresse, levando a alterações dos valores reais dos hormônios circulantes. No experimento, trabalharam com a ave pilrito-semipalmado, também conhecido como “maçariquinho” (*Calidris pusilla*), realizaram uma coleta de sangue assim que as aves foram capturadas e outra 15 minutos depois, para verificar o efeito nos hormônios. Os resultados obtidos mostraram, na segunda coleta, um aumento da corticosterona em todos os animais, já outros hormônios, como testosterona e prolactina, não seguiram um padrão, mas os níveis foram menores na maioria dos animais, em relação à primeira coleta.

Apesar de parecerem ótimas opções, as desvantagens das coletas não invasivas devem ser consideradas, principalmente quando envolve animais em um ambiente não controlado

(Goymann, 2012). Visto que, quando a análise é feita em soro ou plasma, o que está sendo mensurado é a molécula do hormônio em si, quando utilizamos outras amostras biológicas como fezes, urina ou excretas, o que será medido é o produto final do metabolismo, que pode ser modificado intensamente pelos processos naturais, como as bactérias intestinais (Taylor, 1971; Goymann, 2005; Klasing, 2005; Palme, 2005). Dependendo da espécie, esses metabólitos podem ser excretados em maior quantidade na urina ou nas fezes (Pukazhenthil e Wildt, 2004).

De acordo com as revisões de Goymann (2012) e Palme (2005), existem diferenças em vários aspectos quanto à excreção dos hormônios nas fezes. Goymann (2012) trouxe um compilado de trabalhos que encontraram diferenças na excreção entre fêmeas e machos, como o do próprio Goymann (2005) no qual, trabalhando com o cartaxo-comum (*Saxicola rubicola*), um pequeno passeriforme, percebeu que os machos e fêmeas metabolizam a testosterona de formas diferentes, e que a mensuração desse hormônio com o anticorpo que é ótimo para aferir o metabólito de testosterona das excretas dos machos, não é ideal para fêmeas dessa espécie. Ainda na revisão, traz possíveis diferenças ligadas à dieta, à taxa metabólica, quantidade de alimentação ingerida e degradação bacteriana.

O que devemos considerar é que não se pode generalizar um ensaio para todas as espécies, as validações – que ainda serão abordadas – se fazem sempre necessárias. A influência de algumas variáveis, citadas anteriormente, pode ser diminuída quando se trabalha com uma população controlada, de cativeiro.

Amostras

A escolha da amostra que será utilizada deve ser feita levando em conta: a informação que está se buscando; o ensaio que será utilizado; a particularidade da espécie quanto à excreção dos metabólitos; e a logística mais fácil para a realização da coleta, principalmente

quando há exigência de coletas durante longo período (Heistermann, 2010; Hodges et al., 2010).

No trabalho realizado em corujas por Wasser e Hunt (2005), os autores consideraram que o tempo curto entre a secreção e a excreção dos hormônios nas aves, e as excretas serem pouco volumosas, são vantagens para diminuir interferências do metabolismo sobre as amostras. No trabalho foram realizados ensaios utilizando a administração intramuscular de hormônios radiomarcados nos animais, e a coleta de excretas foi realizada em um intervalo constante. Encontraram resultados para todas as espécies de corujas que trabalharam, e para os hormônios testados – glicocorticoides e esteroides sexuais – o tempo para aparecimento nas excretas (*lag time*) foi de uma a quatro horas.

Urina

O uso da urina como amostra biológica para ensaios hormonais iniciou nos anos 80, junto com o aumento da demanda por mais pesquisa científica dentro da gestão de zoológicos. Foi considerada a alternativa mais prática quando comparada à coleta sanguínea e ampliou muito os dados de reprodução e estresse em várias espécies (Hodges, 2010).

Como existem diferenças na concentração da urina entre espécies e indivíduos, é necessário determinar o quão diluído ou concentrada essa amostra está. Para isso é utilizada a mensuração da creatinina, a qual apresenta uma taxa de excreção que correlaciona bem com a taxa dos hormônios. E, dependendo da taxa de depuração renal, ou *clearance* renal, o resultado da dosagem pode refletir a um evento de algumas horas antes da coleta (Hodges, 2010). O *clearance* renal é a taxa em que uma certa substância é retirada do plasma, quando filtrado pelo rim (Cunningham e Klein, 2007).

Na urina, os hormônios apresentam-se da forma conjugada, como sulfato ou glicuronídeo (Möstl, Rettenbacher e Palme, 2005), e utilizando o ensaio correto, é possível analisar diretamente os conjugados de esteroides, sem a necessidade de extração por algum

solvente. O uso da urina como amostra biológica é maior quando se procura hormônios esteroides, porém, há excreção urinária de hormônios peptídicos (formados por resíduos de aminoácidos - hormônio luteinizante, hormônio folículo estimulante e gonadotrofinas coriônicas), que também podem ser dosados (Hodges et al 2010).

Fezes

Os metabólitos de hormônios que são excretados nas fezes refletem os padrões sanguíneos, respeitando a taxa de metabolização e de passagem (Pukazhenth; Wildt, 2004). A taxa de passagem é o tempo em que o conteúdo ingerido pelo animal demora para ser excretado. Em galinhas, utilizando marcadores insolúveis (óxido de cromo, p. ex.), a taxa de passagem foi 1,6 a 2,6 horas depois da ingestão. Este tempo deve ser considerado uma média, visto que vários fatores podem alterar, inclusive a quantidade de proteína e gordura da dieta (Scanes, 2015).

Pelas diferenças no metabolismo de esteroides entre as espécies e até entre espécies próximas, é muito importante a validação cuidadosa dos métodos de ensaio, para se chegar a resultados precisos e significativos (Schwarzenberger, 2007).

Animais que estão em cativeiro são ótimos para serem estudados, visto que as coletas podem ser realizadas com maior frequência, e os estudos ligando endocrinologia, fisiologia, reprodução e estresse, relacionados com fatores ambientais e sociais podem ser executados e analisados para estabelecer como estes impactam na saúde do animal (Schwarzenberger, 2007).

No trabalho com gaviões-reais (*Harpia harpyja*) de Blank e Moreira (2015), foram obtidos bons resultados utilizando excretas para detecção de metabólitos de andrógenos. Em 2015, Ferreira e colaboradores conseguiram resultados satisfatórios analisando metabólitos de glicocorticoides em excretas de papagaio-verdadeiro (*Amazona aestiva*), bem como o trabalho relacionando o estresse e enriquecimento ambiental em araras-canindé (*Ara ararauna*) de

Almeida et al (2016). Os resultados alcançados nos levam a acreditar que as técnicas são adequadas para utilizar em aves, quando feita a validação apropriada.

Validações

Cada hormônio geralmente apresenta vários metabólitos na excreta, e nem todos são conhecidos. Os ensaios utilizados são desenvolvidos para a detecção dos hormônios, em sua forma ativa, e não para metabólitos. Porém, com o crescimento da necessidade das análises hormonais em animais, começou-se a testar a utilização destes ensaios para detecção de produtos do metabolismo dos hormônios. Este passo não é banal, pois a excreção de diferentes metabólitos pode não ser a mesma entre as espécies ou até entre os sexos, ou seja, um método que funciona para uma espécie não necessariamente deve funcionar para outra, mesmo que sejam espécies próximas (Goymann, 2005).

Quando amostras como o sangue são utilizadas, os hormônios estão presentes em maior quantidade em sua forma biologicamente ativa, portanto as reações cruzadas com estruturas similares não são consideradas relevantes. Quando trabalhamos com metabólitos, existem outras infinitas substâncias nas excretas, urina ou fezes, além dos metabólitos hormonais. Caso o anticorpo não tenha reações cruzadas com outras substâncias, não é um grande problema. Porém, deve-se ter certeza que o anticorpo está reagindo, pelo menos em maioria, com metabólitos dos hormônios procurados, e não com substâncias com estruturas similares, mas funcionalmente diferentes dos hormônios. Portanto, para utilizar análises de metabólitos, validações devem ser cuidadosamente realizadas, para assegurar que o ensaio detectará substâncias relevantes (Goymann, 2012) e que realmente reflita os eventos fisiológicos interessantes (Brown, 2008).

Uma das formas mais comuns e baratas de dosagem hormonal é por ensaios enzimáticos (enzimoimunoensaio) ou utilizando isótopos radioativos (radioimunoensaio). A reação é baseada em uma ligação entre antígeno e anticorpo. No caso, o hormônio que está na

amostra é o antígeno, e este vai se ligar a um anticorpo específico contra ele. Este anticorpo é marcado radioativamente ou com enzimas, que vão gerar reações colorimétricas com o seu substrato. Ambas as técnicas utilizam um anticorpo que reage contra o hormônio que está sendo procurado ou reage com moléculas resultantes do metabolismo destes hormônios, e que são excretadas nas fezes e/ou urina dos animais (Goymann, 2012).

Técnicas para validação

Existem algumas técnicas que podem ser utilizadas para a validação do ensaio para um hormônio específico. Segundo o Manual de Endocrinologia do Instituto Smithsonian de Conservação Biológica (SCBI) (Brown, 2008), as validações são essenciais para demonstrar se a dosagem hormonal está realmente refletindo o evento fisiológico que está se buscando.

A validação pode ser realizada utilizando os próprios eventos fisiológicos, onde podem ser comparadas as dosagens obtidas por duas amostras diferentes (p. ex. fezes e urina, dosando metabólitos, ou sangue e saliva, dosando a forma ativa) e comparando padrões de excreção com comportamentos conforme a condição reprodutiva (p. ex. aumento de estrogênio com comportamento de cópula; gestação e aumento de progesterona circulante, seguida do parto com queda na progesterona) (Brown, 2008).

Também pode ser realizada por meio de desafio hormonal, quando é administrado um fármaco que, conhecidamente, estimule a produção hormonal. Além de demonstrar o tempo de excreção após o estímulo da glândula, podemos acompanhar a quantidade de metabólitos excretados pela formação de uma curva, depois de realizadas coletas sucessivas em tempo definido (Fig. 1) (Brown, 2008; Lovas, Johnston e Filippich, 2010).

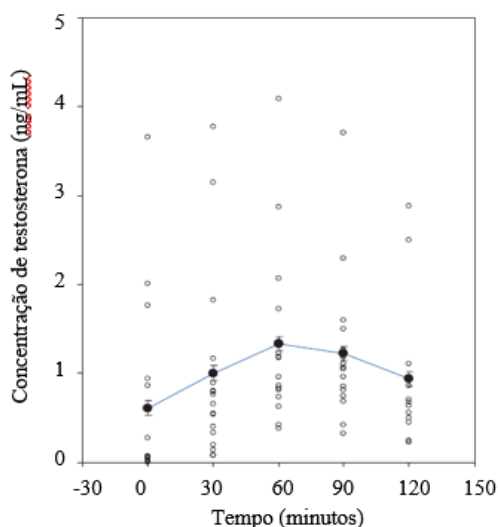


Figura 6: Alterações em concentração de plasma de calopsitas após a injeção de agonista de GnRH, para a validação de ensaio enzimático para testosterona. Podemos observar a curva de excreção, e o pico que se deu em 60 minutos, seguido de um decréscimo. Fonte: Extraído e adaptado de Lovas et al, 2010.

O teste de paralelismo é uma forma de determinar se o ensaio está dosando o que deveria estar dosando, e também indica a diluição da amostra que deve ser usada no teste. Neste teste, é utilizada uma solução padrão, onde temos uma concentração conhecida do hormônio que teve ser dosado, e a amostra que será dosada. É realizada uma diluição seriada em ambas as soluções, (1:1, 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32 ...) e a dosagem é realizada em todas as diluições. As curvas obtidas devem ser paralelas, ou seja, a dosagem da amostra é imunologicamente similar ao padrão, e pode ser dosada proporcionalmente (Fig. 2) (Brown, 2008).

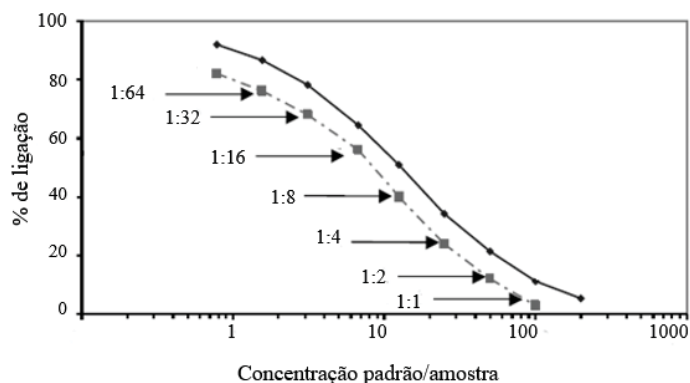


Figura 7: Curva de paralelismo. Dosagem das diluições seriadas (1:1 a 1:64) da solução padrão – concentração do hormônio conhecida (linha sólida) - e da amostra na qual os hormônios estão presentes (linha pontilhada). Ambas as curvas devem ser paralelas, mostrando que a dosagem obtida nas amostras é imunologicamente similar ao padrão. Fonte: Retirado e adaptado de Brown, 2008.

Extração

Antes das análises, os metabólitos de esteroides devem ser extraídos das fezes, pois eles são formados por uma mistura de vários tipos de metabólitos, com diferentes polaridades. Geralmente é realizada com auxílio de um solvente orgânico, separando os esteroides de outros componentes solúveis em água (Wehner e Handke, 1979), aproveitando a característica lipofílica que os hormônios apresentam (Cunningham e Klein, 2007).

Deve-se preferir manter a extração o mais simples possível, apenas ser mais sofisticada caso a concentração seja muito baixa na amostra (Palme, 2005). Estas técnicas também devem ser validadas para cada espécie, e até para cada sexo (Touma e Palme, 2005).

Os esteroides são metabolizados no fígado, inclusive progesterona e testosterona, e a presença dos hormônios não metabolizados nas fezes é praticamente nula (Möstl e Palme, 2002).

Dosagem hormonal

Ensaio imunológico

Com a habilidade de criar anticorpos específicos contra esteroides e peptídeos, surgiram os ensaios imunológicos, o primeiro a surgir foi o radioimunoensaio (RIA) (Pukazhenthil e Wildt, 2004). As técnicas imunológicas são capazes de detectar pequenas quantidades de hormônios nas amostras (Brown, 2008). Os padrões hormonais durante um certo período puderam ser definidos depois do desenvolvimento da coleta de amostras sanguíneas sequenciais, mas essa prática não é segura para ser realizada em todas as espécies (Pukazhenthil e Wildt, 2004). Os ensaios imunológicos são os mais usados quando empregamos amostras como urina, fezes ou excretas (Palme, 2005), porém, técnicas de cromatografia estão começando a ser utilizadas e aprimoradas para o uso com coletas não invasivas (Spercoski, 2019 - comunicação pessoal).

Radioimunoensaio (RIA)

Os ensaios utilizando marcadores radioativos são altamente sensíveis e eram os mais comuns, mas acabam por ser mais complicados, por necessitar de licença especial para o uso de radioisótopos e pelos equipamentos de detecção serem de alto valor (Brown, 2008).

Os RIA's dependem da ligação do antígeno à uma molécula radioativa, geralmente iodo-125 ou hidrogênio-3 (trítio), que serve como o rastreador. A competição de ligação acontece entre o antígeno não marcado, presente na amostra (hormônio na amostra) e uma substância estruturalmente parecida com o antígeno da amostra, porém, marcado com a molécula reativa (Brown, 2008). Ambos antígenos competem pela ligação com o anticorpo que foi desenvolvido especificamente contra o hormônio.

A leitura do ensaio é realizada em um contador de cintilação beta ou gama. O resultado geralmente é inversamente proporcional ao que buscamos, pois teremos a leitura da ligação entre anticorpo e antígeno marcado, e não o antígeno da amostra.

Enzimoimunoensaio (EIA)

Comparados aos RIA's, os ensaios enzimáticos, também conhecidos como ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*, ensaio de imunoabsorção enzimática), apresentam algumas vantagens, como: não utilizar radioatividade; equipamentos de custo mais baixo e reagentes de simples preparo, estáveis e com maior validade. Atualmente, os EIA's já são tão sensíveis quanto os RIA's, e estão ganhando popularidade (Brown, 2008; Wild, 2013).

O EIA baseia-se na ligação entre um antígeno e uma enzima, mantendo tanto as atividades enzimáticas quanto imunológicas no conjugado (antígeno marcado). Geralmente esse conjugado é um hormônio ligado a uma peroxidase de raiz forte (HRP, do inglês, *horseradish peroxidase*), que serve como rastreador. Esse hormônio, conjugado com a enzima, compete com o hormônio presente na amostra (antígeno na amostra) pela ligação com o anticorpo, que foi desenvolvido especificamente contra o hormônio (Brown, 2008).

A reação de revelação ocorre após certo tempo de incubação, que depende do protocolo que é utilizado. Como haverá a ligação entre o anticorpo aos dois antígenos presentes na solução, é adicionado o substrato da enzima, que se liga a ela e causa a alteração de cor. Quando a enzima utilizada é o HRP, podem ser usados os substratos ABTS (ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico)) que gera cor verde, ou o TMB (tetrametil-benzidina) que gera uma coloração azul (Brown, 2008; Wild, 2013).

A reação colorimétrica é inversamente proporcional ao resultado procurado: quanto mais intensa a cor, menor a quantidade de hormônio presente naquela amostra, pois o conjugado que promove a formação de cor é o hormônio sintético marcado (Brown, 2008; Wild, 2013). A leitura é feita por espectrofotometria, para estimar a intensidade da coloração e assim a concentração do que está sendo analisado (Wild, 2013).

Considerações finais

Técnicas de dosagem hormonal não invasivas estão sendo cada vez mais exploradas dentro da área de endocrinologia animal. Com a conscientização do estresse causado pela manipulação do animal e os riscos anestésicos, as técnicas vêm sendo validadas para várias espécies e, na maioria dos casos, são usadas com sucesso.

Com o crescimento dos trabalhos com reprodução assistida em animais silvestres, tanto para populações em cativeiro quanto para recolocação da espécie quando extintas localmente, é cada vez mais importantes o conhecimento dos ciclos hormonais ligados à reprodução e como estes podem ser afetados.

Portanto, a modernização das técnicas e o trabalho com amostras que diminuem o contato com o animal, mas mesmo assim trazem bons resultados para as pesquisas e trabalhos de conservação, continuará crescendo, à medida em que a ciência da endocrinologia também se desenvolve.

Referências

- Brown, J.** Wildlife Endocrinology Manual. Smithsonian National Zoological Park, Conservation and Research Center (Publicação interna), 2008.
- Cunningham, J. G.; Klein, B. G.** Veterinary physiology. Missouri: Saunders Elsevier, 2007.
- Blank, M. H.; Moreira, N.** Perfil anual de andrógenos em gaviões-reais (*Harpia harpyja*) e sua correlação com comportamento reprodutivo e fatores ambientais. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Paraná, 2015.
- Buchanan, K. L.; Goldsmith, A. R.** Noninvasive endocrine data for behavioural studies: the importance of validation. *Animal Behaviour*, v. 67, n. 1, p. 183–185, 2004.
- Ferreira, J. C. P.; et al.** Non-invasive measurement of adrenocortical activity in blue-fronted parrots (*Amazona aestiva*, Linnaeus, 1758). *PloS one*, v. 10, n. 12, 2015.
- Goymann, W.** Noninvasive monitoring of hormones in bird droppings: physiological validation, sampling, extraction, sex differences, and the influence of diet on hormone metabolite levels. *Annals of the New York Academy of Sciences*, v. 1046, n. 1, p. 35–53, 1 jun. 2005b.
- Goymann, W.** On the use of non-invasive hormone research in uncontrolled, natural environments: the problem with sex, diet, metabolic rate and the individual. *Methods in Ecology and Evolution*, v. 3, n. 4, p. 757–765, 2012.
- Gratto-Trevor, C. L.; Oring, L. W.; Fivizzani, A. J.** Effects of blood sampling stress on hormone levels in the semipalmated sandpiper. *Journal of Field Ornithol.*, v. 62, n. 1, p. 19–27, 1991.
- Heistermann, M.** Non-invasive monitoring of endocrine status in laboratory primates: methods, guidelines and applications. *Advances in Science and Research*, v. 5, n. 1, p. 1–9, 2010.
- Hodges, K., Brown, J. & Heistermann, M.** Endocrine monitoring of reproduction and stress. In: Kleiman, D. G.; Thompson, K. V.; C. Baer, K. (Eds.). *Wild mammals in captivity: Principles and techniques for zoo management*. 2. ed. Chicago, IL: University of Chicago Press, 2010. p. 447–468.
- Klasing, K. C.** Potential Impact of Nutritional Strategy on Noninvasive Measurements of Hormones in Birds. *Annals of the New York Academy of Sciences*, v. 1046, n. 1, p. 5–16, 2005.
- Lovas, E.; Johnston, S.; Filippich, L.** Using a GnRH agonist to obtain an index of testosterone secretory capacity in the cockatiel (*Nymphicus hollandicus*) and sulphur-crested cockatoo (*Cacatua galerita*). *Australian Veterinary Journal*, v. 88, n. 1–2, p. 52–56, 2010.
- Möstl, E.; Palme, R.** Hormones as indicators of stress. *Domestic Animal Endocrinology*, v. 23, p. 64–74, 2002.
- Möstl, E.; Rettenbacher, S.; Palme, R.** Measurement of corticosterone metabolites in birds' droppings: An analytical approach. *Annals of the New York Academy of Sciences*, v. 1046, p. 17–34, 2005.
- Palme, R.** Measuring fecal steroids: Guidelines for practical application. *Annals of the New York Academy of Sciences*, v. 1046, p. 75–80, 2005.
- Pukazhenthi, B. S.; Wildt, D. E.** Which reproductive technologies are most relevant to studying, managing and conserving wildlife? *Reproduction, Fertility and Development*, v. 16, n. 2, p. 33–46, 2004.
- Scanes, C. G.** *Sturkie's Avian Physiology*. 6 ed. Elsevier, 2015.
- Schwarzenberger, F.** The many uses of non-invasive faecal steroid monitoring in zoo and wildlife species. *International Zoo Yearbook*, v. 41, n. 1, p. 52–74, 2007.
- Taylor, W.** The excretion of steroid hormone metabolites in bile and feces. *Vitamins and Hormones*, Academic Press, v. 29, 1971.

Touma, C.; Palme, R. Measuring fecal glucocorticoid metabolites in mammals and birds: The importance of validation. *Annals of the New York Academy of Sciences*, v. 1046, p. 54-74, 2005.

Wasser, S. K.; Hunt, K. E.; Brown, J. L.; Cooper, K.; Crockett, C. M.; Bechert, U.; Millspaugh, J. J.; Larson, S.; Monfort, S. L. A generalized fecal glucocorticoid assay for use in a diverse array of nondomestic mammalian and avian species. *General and Comparative Endocrinology*, v. 120, n. 3, p. 260–275, 2000.

Wasser, S. K.; Hunt, K. E. Noninvasive measures of reproductive function and disturbance in the barred owl, great horned owl, and northern spotted owl. *Annals of the New York Academy of Sciences*, v. 1046, n. 2005, p. 109–137, 2005.

Wehner, R.; Handke, A. An improved extraction method for plasma steroid hormones. *Clinica Chimica Acta*, v. 93, p. 429-431, 1979.

Wild, D. *The Immunoassay Handbook. Theory and Applications of Ligand Binding, ELISA and Related Techniques.* 4 ed. Elsevier, 2013.

CAPÍTULO 3

Sex determination in Brazilian macaws (*Ara ararauna*, *A. macao* and *A. chloropterus*) by enzymeimmunoassay of excreta sex steroid metabolites

Bruna Todeschini Vieira¹, Katherinne Spercoski², Janine Brown³, Nei Moreira²

¹Federal University of Paraná, Biological Sciences Sector, Curitiba, PR, Brazil; ²Federal University of Paraná, Biosciences Department, Palotina Sector, Palotina, PR, Brazil. ³Smithsonian Conservation Biology Institute, Front Royal, Virginia, USA.

ABSTRACT

Most Psittacidae species do not present sexual dimorphism, making it difficult to recognize between males and females. Sexing techniques have been developed to make it easy and simple, but the commonly used blood samples, even from feathers, require a collection that can be dangerous and stressful for both animal and handler. Hormonal dosage can be used with success for sexing, and non-invasive hormonal dosage techniques, with the use of excreta, have been improved to fit most species. In this research, excreta of 17 macaws (13 *Ara ararauna*, 3 *A. macao* and 1 *A. chloropterus*), 10 males and 7 females, from the Municipal Zoo of Cascavel (County Park Danilo Galafassi) were collected, three samples for each animal, through the month of February, 2018. All animals had their sexes previously defined by Polymerase Chain Reaction (PCR). We were able to validate the immunoassay technique for progestogen and androgen for these three species of Brazilian macaws and from that, to use a ratio between progestagens/androgens for sexing. Results are presented as mean \pm SD. The androgen concentration did not differ significantly between males and females ($p=0.378$), but progestogens concentration had a significant difference between sexes (females 204.7 ± 36.7 pg/g excreta; males 90.8 ± 9.4 pg/g excreta; $p<0.001$). The progestagens/androgens metabolite ratio had a difference ($p<0.001$) between females (3.0 ± 0.3) and males (1.3 ± 0.2). Birds with ratio higher than 2 were considered females, and values with ratio under 2 were considered male, reaching an accuracy of 90%.

Keywords: Endocrinology, birds, sexing, ratio.

INTRODUCTION

Sexual dimorphism can be defined as the phenotypic differences between males and females, that is, external characteristics such as colors, shapes and dimensions, which are different between sexes (Straube et al., 2010). Most bird species in the world do not present sexual dimorphism (Griffiths and Phil, 2000), and the visualization of any sex organ is not viable in various birds, because the cloaca is the “sexual organ” - Sex definition is essential both for *in situ* management, especially in conservation programs for genetically viable

populations (Guedes, 2004), and for *ex situ* management, when it comes to breeding and maintenance projects (Morinha et al., 2012).

The macaws, belonging to the order Psittaciformes, family Psittacidae, along with parrots, are the most admirable birds among the tropical species. They were heavily trafficked and illegally traded to be raised as pets (Maria and Guedes, 2004). The macaws species that were approached at this research (*Ara ararauna*, *A. macao* and *A. chloropterus*) are classified as “least concern” on the Red List of Endangered Species, but with the observation that, if trade is not controlled, the classification can be changed (BirdLife International, 2019).

Within the options of biological samples, bird's excreta have several information about the organism and its metabolism. Compared to blood, which is the sample of choice in most trials and exams, excreta have some advantages, starting with non-invasiveness, so it does not introduce variables that can alter results, and can be applied to long term studies, that require several collections. Feces have come as a good substitute for research on animals of small size or species that stress easily (Pukazhenthil and Wildt, 2004; Schwarzenberger, 2007).

The objectives of this research involved the validation of the enzymeimmunoassay technique for the determination of steroid metabolites in macaws' excreta, and to use these values to determinate the sex of the bird.

1 MATERIAL AND METHODS

1.1 Sample collection

This project was approved by the Commission on Ethics and Use of Animals (CEUA/UFPR - Palotina Sector) under protocol nº 11/2018 -

CEUA/Palotina. The collection and transport of the biological samples (excreta) were authorized by SISBIO - System of Authorization and Information on Biodiversity, of the Chico Mendes Institute of Biodiversity Conservation - ICMBio, under protocol nº 626213-1.

A total of 17 adult animals were used for this work, which 13 are blue and gold macaws (*Ara ararauna*), three scarlet macaws (*Ara macao*) and one red-and-green macaw (*Ara chloropterus*) (Table1). All animals were housed at Municipal Zoo of Cascavel (Municipal Park Danilo Galafassi), PR, Brazil, in four different enclosures (Table 2). We were unable to define the age of the animals, but we had the information of when they arrived at the Zoo.

Table 1: Number of macaws at the Municipal Zoo of Cascavel (Municipal Park Danilo Galafassi), in February 2017.

Species	Males	Females	Total
Blue-and-gold macaw (<i>Ara ararauna</i>)	7	6	13
Scarlet macaw (<i>Ara macao</i>)	2	1	3
Red-and-green macaw (<i>Ara chloropterus</i>)	1	0	1
Total	10	7	17

Table 2: Distribution of macaws at the Municipal Zoo of Cascavel – PR - Brazil. The animals were distributed according to affinity. The couples are flagged with a superscript number; both males with an asterisk had a couple behavior. All animals have a ring with the zoo number.

Enclosure	Species	Sex	Number	Estimated age	Source
20B	<i>Ara ararauna</i> ¹	Male	141	> 15 years	Illegal trade
20B	<i>Ara ararauna</i> ¹	Female	12	> 16 years	Donation
20B	<i>Ara ararauna</i>	Male	143	> 15 years	Illegal trade
22A	<i>Ara macao</i> *	Male	11	> 17 years	Illegal trade
22A	<i>Ara ararauna</i> *	Male	162	> 25 years	Donation
22A	<i>Ara macao</i>	Male	145	> 12 years	Illegal trade
22A	<i>Ara macao</i>	Female	007	> 21 years	Illegal trade
22A	<i>Ara ararauna</i>	Female	161	> 25 years	Donation
22A	<i>Ara ararauna</i>	Female	139	> 13 years	Illegal trade
07	<i>Ara ararauna</i> ³	Female	159	> 4 years	Illegal trade
07	<i>Ara ararauna</i> ³	Male	147	> 4 years	Illegal trade
07	<i>Ara ararauna</i>	Female	148	> 4 years	Illegal trade
07	<i>Ara ararauna</i> *	Male	146	> 4 years	Illegal trade
07	<i>Ara ararauna</i> *	Male	165	> 4 years	Illegal trade
07	<i>Ara ararauna</i> ⁴	Male	160	> 4 years	Illegal trade
07	<i>Ara ararauna</i> ⁴	Female	164	> 4 years	Illegal trade
23C	<i>Ara chloropterus</i>	Male	003	> 24 years	Donation

Samples were collected in February, 2018, being three samples of each animal. The macaw's reproductive season is September through February, spring and summer time in Brazil. The excreta were collected from the ground, after observation of the animal defecating, with a wood stick that was subsequently discarded. All samples were accommodated in identified “ziplock” plastic bags and frozen in a common freezer, maximum of 12 hours after collection (Palme, 2005).

1.2 Extraction

All reagents used in the present study, except when specified, were from the same company (Sigma-Aldrich), and the solutions used were prepared with ultrapure water (Puritech-Permution System, E.J. Krieger & Co. Ltd.).

The procedures used to extract the metabolites of progestogens (PEM) and androgens (AEM) from excreta were done as described by Palme et al. (2013). Briefly, the extraction consisted of weighing approximately 0.5 g of moist excreta in a glass test tube, adding 5.0 mL of 60% methanol (3.0 mL of absolute methanol and 2.0 ml of distilled water). After this step, tubes were capped and vortexed with 1-2 second pulses for 30 minutes on a multi-pulse Vortex (model 099th VB4, 50/60Hz Multi-Pulse, GlasCol®, Indiana, EUA). The tubes were then centrifuged at 1000G for 15min (Scientific-Heraeus Megafuge 16R Centrifuge, Thermo Scientific, Massachusetts, EUA) and the supernatant was transferred to a microcentrifuge tube, properly identified and stored in a -20°C freezer until the validation tests were carried out.

1.3 Validation:

1.3.1 Parallelism

Prior to the start of the trials, validation of the method for AEM and PEM of macaws was required, to verify the existence of immunogenic similarity between the antigen used as standard in the assay, and the antigen to be assayed in the sample. The antibodies (Coralie Munro - University of California, Davis, CA, USA) used in the immunoassays were produced against the plasma (non-metabolized) form of human steroids and, therefore, their ability to detect the metabolized forms of the hormone present in excreta extracts should be investigated for the species under study (Touma and Palme 2005).

The technical method of validation is the parallelism test, which verifies the immunogenic similarity and, at the same time, determines the most appropriate dilution of the extracts for the dosage. In order to do so, a mixture of aliquots (*pool*) of the 34 hormonal challenge samples were mixed between the females' samples (*female pool*) and the males' samples (*male pool*). The parallelism test was realized as described in the Endocrine Manual (Brown et al., 2008).

1.3.2 Hormonal challenge

Due to the fact that this was the first study that used the enzymeimmunoassay (EIA) method to evaluate excreta metabolites of macaws' androgens and progestogens, the biological validation test was also carried out. Biological validation was done using the synthetic GnRH challenge protocol.

For the challenge, it was used Busereline acetate (Sincroforte®, OuroFino, Cravinhos, São Paulo, Brazil), a synthetic analogue to the gonadotropin-releasing hormone (GnRH). In addition to demonstrating the time of excretion after the stimulation of the gland, we can monitor the amount of metabolites excreted by the formation of a curve after successive time-definite collections (Brown, 2008; Lovas et al, 2010).

Before the administration of busereline acetate, dropping samples were collected for the "zero" time. Three couples were submitted to the application, they were manually restrained with the aid of a net, weighed with a portable scale and Busereline acetate was injected in each animal (8 mg/kg, IM, Lovas

et al. 2010; Wild, 2013). Excreta samples were collected 2, 4, 6, 8 and 24 h after the initial application.

1.4 Enzyme immunoassay

1.4.1 Antibody

To perform the assays, microplates (NUNC® Immuno TM plates, Maxisorp®, Waltham, MA, USA) were covered with:

1) 50µl of anti-testosterone antibody (Polyclonal 156/7; Coralie Munro - University of California, Davis, CA, USA, diluted 1: 10,000); or

2) 50µl of anti-pregnane antibody (Monoclonal CL425; Coralie Munro - University of California, Davis, CA, USA, diluted 1: 10,000);

After pipetting, the plates are conditioned at 4°C for at least 12 hours. The standard curve for each assay was prepared for progesterone and testosterone at concentrations of 4,000 pg/mL and 12,000 pg/mL, respectively, considered the highest standards. The curve was serially diluted 1:1 with EIA assay solution (NaH₂PO₄, NaHPO₄, NaCl, BSA, pH adjusted to 7.00) eight times to reach the concentrations of 31.2 pg/mL and 46 pg/mL, respectively, considered the lowest standards for each hormone.

The conjugated hormones progesterone-HRP and testosterone-HRP (Coralie Munro - University of California, Davis, CA, USA) were diluted 1:40,000 and 1:20,000 respectively; and kept at 4°C until the time of the test.

The enzyme substrate solution was immediately prepared prior to its addition on the microplate and consisted of 0.5M H₂O₂; ABTS® (Calbiochem, ABTSTM Chromophore, Diammonium Salt) and substrate solution for ELISA (citric acid; pH adjusted to 4.00).

1.5 Assays

The microplate already coated with antibodies was washed five times with ELISA wash solution (NaCl; Tween 20) and excess solution was removed by tapping the plate on paper towels. All the washing was performed by hand, without using a plate washer. The washing solution was added to the wells and discarded immediately after filling the well. It was added 50µl of ELISA assay solution (NaH_2PO_4 , NaHPO_4 , NaCl, BSA, pH adjusted to 7.00) to all wells of the plate and incubated for 4 hours at room temperature with gentle shaking on a Multi -Press Vortexer (model 099A VB4, 50/60Hz Multi-Pulse, GlasCol®, Indiana, EUA) at 200 rpm.

The second incubation period was followed by the second wash of the plate, in the same manner as the first. Immediately after the second wash, 50µL of standard solutions, 50µL of control solutions and samples, all in duplicates, and 50µL of progesterone-HRP enzyme-labeled solution or testosterone-HRP enzyme-labeled solution were pipetted into all wells, except wells considered as white. The whole pipetting process took, on average, 6 minutes, not exceeding 10 minutes. Both female and male samples were tested for both hormones, progesterone and testosterone.

The microplate was incubated for two hours at room temperature with gentle shaking on a Multi-Pulse Vortexer (model 099A VB4, 50/60Hz Multi-Pulse, GlasCol®, Indiana, USA) at 200 rpm. After incubation, the microplate was washed again, and 100µL of the enzyme substrate solution was added to each well, except in the blank wells.

The microplate was moderately agitated on a Multi-Pulse Vortexer (model 099A VB4, 50/60Hz Multi-Pulse, GlasCol®, Indiana, EUA) at 300 rpm

until the wells considered as zero reached optical density (OD) between 0.7 and 1.0; when reading the absorbance at 405 nm on the microplate reader (Infinity 200pro, Tecan Trading AG, Switzerland). Microsoft Excel and Prism8, (GraphPad Software for Windows, San Diego, California, 2019) worksheets were used for calculations.

1.6 Data analysis

The overall data of the animals were combined and divided into different groups, considering the gender, for statistical analysis and checked for equivalence and normality. Parametric data were statistically analyzed using non-coupled t-test. Non-parametric data were analyzed using Mann-Whitney rank sum test. All analyses were considered significant when $P < 0.05$. The analysis was made with specific software (Prism8, GraphPad Software for Windows, San Diego, California, 2019) and the results are presented in ng/g of wet excreta.

2 Results

2.1 Technical and biological validation

2.1.1 Parallelism

Samples of macaw's excreta were extracted, mixed in a pool of all three samples of each animal, and dosed for androgens (AEM) (Fig. 1) and progestogens (PEM) (Fig. 2) excreta metabolites, with 7 samples from females and 10 samples from males. The assays for technical validation (parallelism) demonstrated immunogenic similarity between the PEM and AEM of macaw's testosterone and progesterone used as standards. Regression factors for androgens were $R=0.99$ for males and $R=0.98$ for females; for progestogens

were $R=0.99$ for males and $R=0.97$ for females. This factor shows how close is the analysed curve from the standart curve.

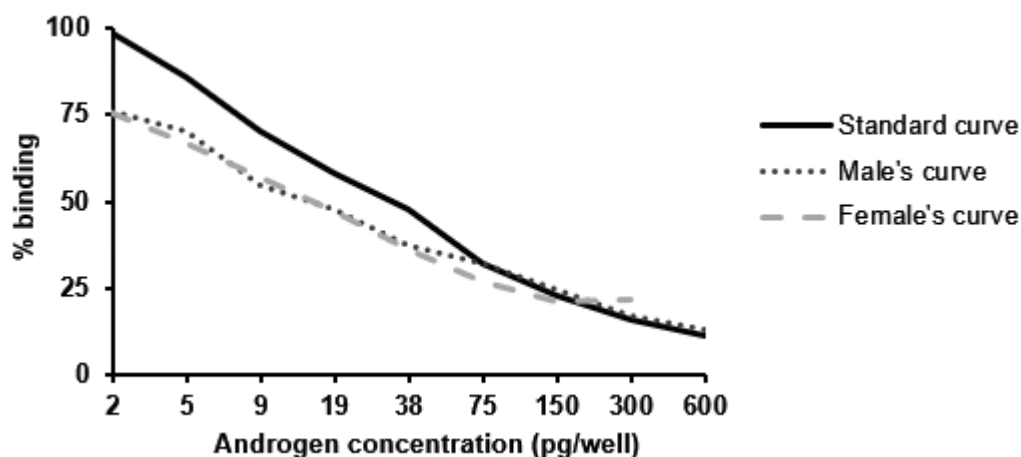


Figure 1: Androgen parallelism test in macaw's excreta. The objective of the test is to check if the dosage of the serial diluted pool of samples accompanies the standards serial dilution dosage. Solid line represents the standard concentration versus binding percentage. Dotted line represents the male's progestogen concentration and dashed line the female's concentration.

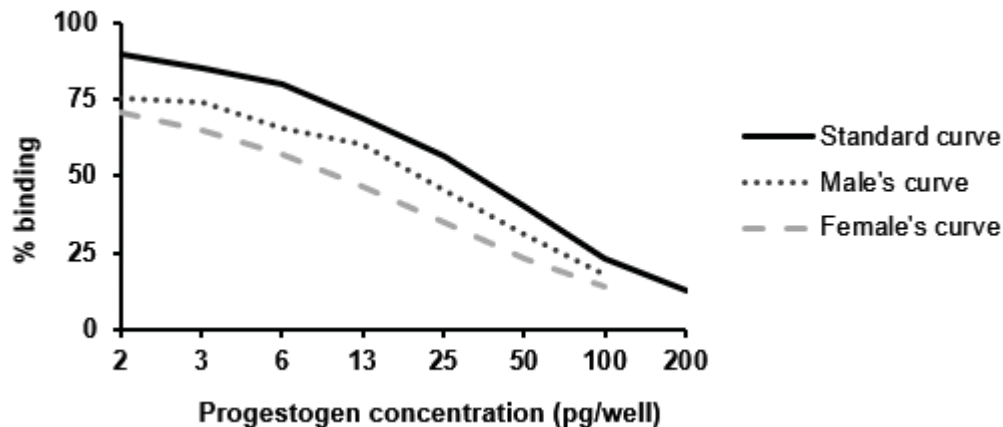


Figure 2: Progesterone parallelism test macaw's excreta. The objective of the test is to check if the dosage of the serial diluted pool of samples accompanies the standard serial dilution dosage. Solid line represents the standard concentration versus binding percentage.

The optimal dilution factors for excreta extracts were determined as 1:256 for both steroids in females, and 1:128 and 1:256 for progesterones and androgens, respectively, in males. These dilutions were closest to the center of the standard curve (~50% binding).

The intra- and inter-assay coefficients of variation (CV) were, respectively, 2.86% and 13.32% for progestogens and 3.24% and 14.97% for androgens.

2.1.2 Hormonal challenge

The expected result would be to observe a curve with gradual increase and decreasing over time. However, not all animals responded to the test (Fig. 3), which was expected, because not all of them had CLs. We had one animal that responded as expected, a female (number 12), that was the only female that had egg laying that year, which validates the test (Fig. 4).

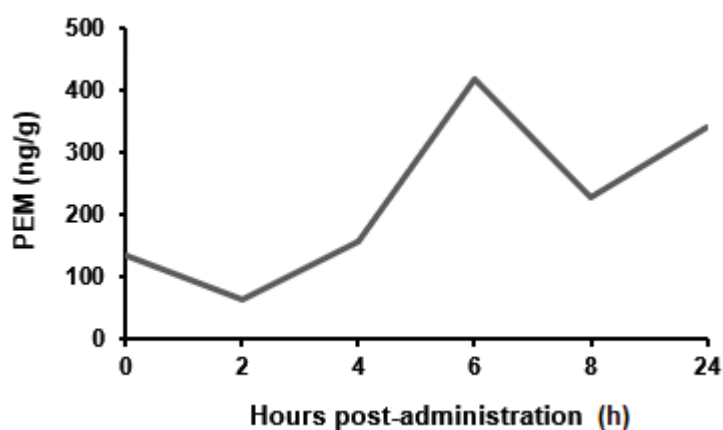


Figure 3: Results over time, from female number 148, of the hormonal challenge with IM administration of a GnRH analogue. After 2 h of administration, an increase happened, and after 24 h, progestagens concentration started to increase again.

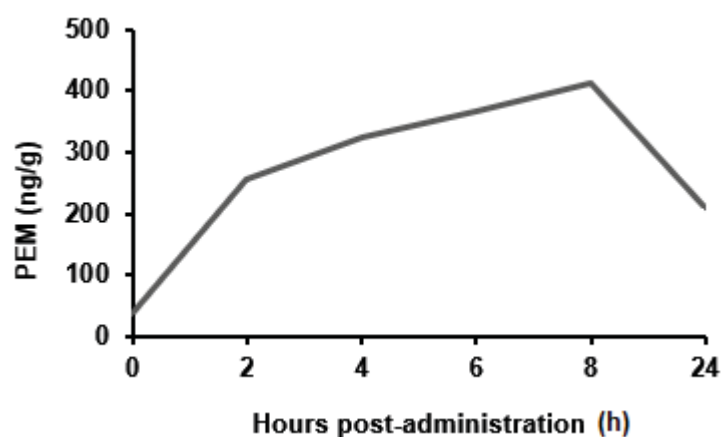


Figure 4: Results over time, from female number 12 (*Ara ararauna*), of the hormonal challenge with IM administration of a GnRH analogue. The line represents the expected result, an increasing of progestogen metabolites (PEM), reaching a peak, and decreasing over time.

2.2 Hormonal Dosage

The results for females are listed in Table 3, for males are listed in Table 4. Two males (145 – *Ara ararauna*; 11 – *Ara macao*) had values of PEM and AEM closer to the female's value.

Table 2: Dosage values of excreta metabolites in pg/g of wet excreta. Left column (bold) is the ID number of the animal's ring. The two animals (males) with asterisks indicate samples that had dosage values closer to the female's androgen metabolites concentration. Average (\pm SEM) values are demonstrated in the last line.

PEM				AEM			
Females		Males		Females		Males	
7	200.47	141	80.53	7	88.14	141	103.7
164	213.77	147	87.86	164	52.88	147	57.5
148	92.46	145*	160.36	148	47.78	145	46.88
161	134.66	165	79.7	161	45.24	165*	96.99
12	188.33	162	82.23	12	64.25	162	80.72
159	401.58	143	95.68	159	94.02	143	67.06
139	201.54	11*	119.87	139	69.75	11	85.18
		146	73.74			146*	63.99
		160	55.69			160	63.92
		3	72.02			3	76.36
Mean \pm SEM	200.47 \pm 58.85	87.86 \pm 22.41		64.25 \pm 15.40		80.72 \pm 16.90	

2.3 Sexing or sex determination

The total PEM values among females (n=7) and males (n=10) of macaws were compared. The total mean (\pm SEM) of PEM (ng/g excreta) found, respectively, were 204.7 ± 36.7 ng/g for females and 90.8 ± 9.4 ng/g for males. There was a difference ($p=0.0012$) between the analyzed groups, with females showing higher total PEM levels than males (Fig. 5).

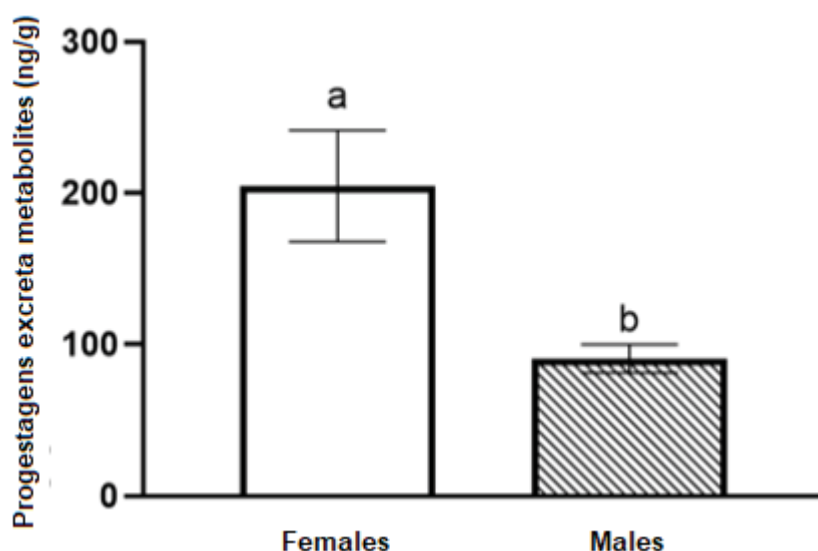


Figure 5: Total concentrations of progestagens excreta metabolites (PEM) (ng/g of excreta; mean \pm SEM) in macaws' females and males. NOTE: a, b - differences between groups ($p=0.0012$).

Considering the androgen metabolites, the means (\pm SEM) of total AEM (ng/g excreta) between females (n=7) and males (n=10) of macaws founded were 66.0 ± 7.3 and 74.2 ± 5.6 , respectively. There were no differences ($p=0.378$) between the analyzed groups (Figure 6).

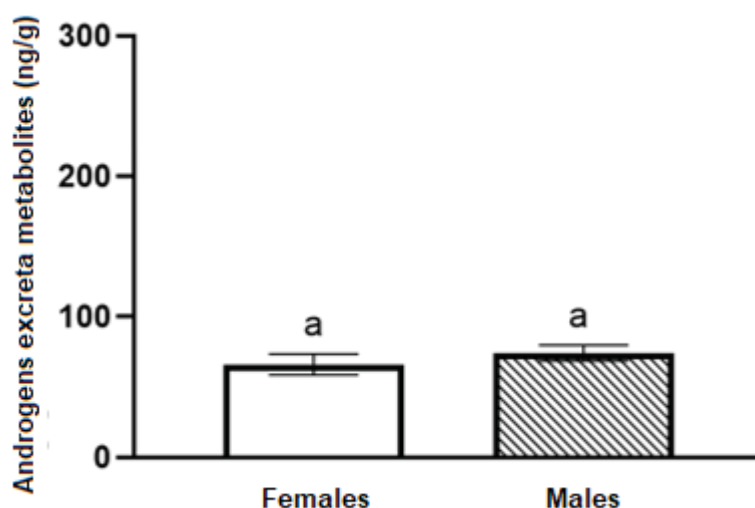


Figure 6: Mean (\pm SEM) concentration (ng/g) of androgens excreta metabolites (AEM); in macaws' females and males. NOTE: a - no differences between groups ($p=0.378$).

To better evaluate the differentiation between sexes, the progesterone/androgens ratio (P/A) was also analyzed. This ratio is already well established in some species of mammals, especially in species with a well-defined reproductive season, and as a good predictor of gender determination (Velloso et al, 1998; Spercoski et al, 2012). In general, the P/A rate is lower, within reproductive seasons, in males and non-cycling females than in cycling females, allowing at least 80% of the samples to be correctly identified, with particular high success for females in proestrus, estrus or diestrus; that is, those that are reproductively active in mammals. For birds, this ratio has not yet been analyzed and although our results showed that progesterone levels alone could be used, it was also decided to check whether this ratio can be also useful in birds.

There was a difference ($p=0.002$) in P/A metabolite ratio between females and males; with females presenting 3.0 ± 0.3 (mean \pm SEM) and males presenting 1.3 ± 0.2 (Fig. 7). These results show that this ratio can also be used

for this Psittacidae species, with 90% accuracy. Every value with ratio >2 was considered a reproductively active female. In the other side, values with ratio <2 were considered a male or a not reproductively active female.

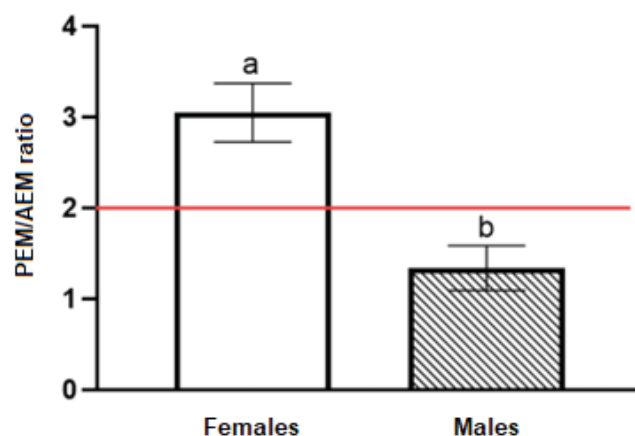


Figure 7: Ratio progestogens excreta metabolites (PEM)/androgens excreta metabolites (AEM) in macaw females and males. NOTE: a, b - differences between groups ($p=0.002$).

3 Discussion

The results obtained of the parallelism validation assay showed that the method is technically effective for detection of androgens and progestogens immunoreactive urofecal metabolites. The physiological validation did not work for most animals, considering that only females with CLs would respond, but one female (female 12, *Ara ararauna*) had a good response, indicating that it works for species. The reason the female showed a good challenge curve, may be because she was the only female that had egg laying in that year, approximately one month earlier from the challenge.

With the steroid dosage, we were able to determine the sex of the macaws by two ways: 1) high concentration of progesterone metabolites and 2) the ratio progestogen/androgens, both with a 90% success rate. Dias and Oliveira (2006) had a success rate of 70%, when they measured androgen and

estrogen excreta metabolites in small parrots by radioimmunoassay. In 1978, Bercovitz et al., measuring estrogens and androgens metabolites in Psittacines droppings, also using radioimmunoassay, obtained a success rate of 63.5%, using the ratio factor. In a work with several species of birds, Stavy et al. (1979) obtained 70% success in determining the sex, also using the ratio between estrogens and androgens, with radioimmunoassay technique.

The female's progestogens source is mainly from the collapsed follicles after ovulation, which consist of a large amount of progesterone-containing granulosa cells. This progesterone assists in the deposition of the main protein for the egg formation, avidin. Progesterone is one of the most abundant progestins, but pregnenolone, 17 α -hydroxypregnenolone and 17 α -hydroxyprogesterone still exist. They are produced in the adrenal cortex, the gonads in both sexes, and the adipose tissue in females, and are intermediates of the synthesis of most other steroid hormones (Hodges, 2007).

On the PEM dosage, we had two males that presented values closer to the female's average. Male 145, an *Ara macao* presented 160.36 pg/g (average of females 200.47pg/g; males 87.86pg/g; 46,88pg/g AEM – average of females 64,25pg/g; males 80,72pg/g). This male did not present reproduction behavior (scratching and feeding a female, building nest, etc). He lived with two other females (161 and 7), that did not present reproductive behavior as well. The male 11, an *Ara macao* as well, presented 119,87pg/g PEM (average of females 200.47pg/g; males 87.86pg/g) and 85,18pg/g AEM (average of females 64,25pg/g; males 80,72pg/g). It also lived with another male (162) (presented 82,23 pg/g PEM; 80,76 pg/g AEM) , and did not present reproductive behavior, sometimes had a couple's behavior with male 162 (scratching, feeding, etc.).

There is nothing published yet about these high values of progestogens and homosexuality among macaws, but there are cases of same sex parenting and mounting (Poiani, 2008; Zuk and Bailey, 2008).

We have found a significant difference ($p=0,0012$) between progestogens concentration of males and females, but not in androgens concentration, which did not corroborate with the information obtained by Dias and Oliveira (2006), who found significant differences in androgen concentration. The non-significant androgen difference between males and females is also described in another bird species, especially when the male exhibit parental care (Buntin et al. 1991; Hall 1986; Khan et al. 2001; Sockman et al. 2004), which is the case of macaws.

In 1994, Wingfield brought to the book “differences between the sexes” the positive relationship between absolute dimorphism index (mean of the sum scores from body size, plumage, and territorial aggression) and the ratio of circulating testosterone in males versus females. Lormée et al. (2000) found that the red-tailed tropicbird (*Phaethon rubricauda*), that has low dimorphism, fits such relation, males and females had a testosterone ratio close to 1, in pre-laying phase. Also, after the egg laying, both sexes defend the nest against predators and invasions, which can bring the couple’s testosterone levels closer.

According to Guedes (2009), reproductive success comprehends the successful oviposition and parental care, until the chick flies away from the nest. The macaws at the Municipal Zoo of Cascavel do not present breeding success for a long time. These closer levels of testosterone might be one of the reasons of that, since without a good level of steroids, males do not have

spermatogenesis or breeding behavior (Cunningham and Klein 2007; Norris 2007; Norris e Lopez 2011). The reason for this non-success has to be investigated, because it can be for many reasons, like visitor's stress, nutrition, not appropriate enclosures, diseases, among others (Cunningham and Klein 2007; Norris 2007).

The advantage of using this technique is mainly the minimal contact with the animal, which does not cause stress and has been much studied in the area of endocrinology. But the disadvantage is the need for the animal to be in adult and reproductive age, to be in the reproductive season, if the species presents, and the cost of the technique - when it is linked to research laboratories or University, the value is significantly lower.

Therefore, this work brought results that validate the enzymeimmunoassay (EIA) technique for the determination of progesterone and testosterone metabolites in three species of Brazilian macaws (*Ara ararauna*, *A. macao* and *A. chloropterus*). With the obtained results, it was possible to determine the sex of the animals, with 90% accuracy, using the ratio between progesterone/testosterone levels and only progesterone levels. bringing a new method for sexing macaws, non-invasively and easy to perform. This method can help in breeding management, assisted reproduction techniques in captivity and maintenance of wild populations of these species.

4 References

- Bercovitz, A. B.; Czekala, N. M.; Lasley, B. L. (1978) A new method of sex determination in monomorphic birds. **The Journal of Zoo Animal Medicine**, v. 9, n. 4, p. 114.
- BirdLife International (2018). *Ara ararauna*. **The IUCN Red List of Threatened Species** 2018: e.T22685539A131917270. <http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2018-2.RLTS.T22685539A131917270.en>. Downloaded on 07 February 2019.
- Buntin, J. D.; Becker, G. M.; Ruzycski, E. (1991) Facilitation of parental behavior in ring doves by systemic or intracranial injections of prolactin. **Hormones and Behavior**, v. 25, n. 3, p. 424–444. Academic Press.
- Cunningham, J. G.; Klein, B. G. (2007) **Textbook of Veterinary Physiology**. Missouri: Saunders Elsevier, 2007.
- Dias, E. A.; Oliveira, C. A. (2006) Determinação do sexo de psitacídeos por radioimunoensaio (RIE) de esteróides sexuais a partir de excretas cloacais. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 43, p. 5–11.
- Grespan, A.; Raso, T. F. Psittaciformes (Araras, Papagaios, Periquitos, Calopsitas e Cacatuas). In: Cubas, Z. S., Silva, J. C. R.; Catão-Dias, J. L. (2014) **Tratado de Animais Selvagens: Medicina Veterinária**. São Paulo: Roca
- Griffiths, R.; Phil, D (2000). Sex identification in birds. **Seminars in avian and exotic pet medicine**, v. 9, n. 1, p. 14–26.
- Guedes, N. M. R. (2004) Management and conservation of the large macaws in the wild. **Ornitologia Neotropical**, v. 15, p. 279-283.
- Guedes, N. M. R. (2009). **Sucesso reprodutivo, mortalidade e crescimento de filhotes de araras azuis *Anodorhynchus hyacinthinus* (Aves, Psittacidae) no Pantanal, Brasil**. Doctorate thesis, State University of Sao Paulo (UNESP).
- Hall, M. R. (1986) Plasma concentrations of prolactin during the breeding cycle in the cape gannet (*Sula capensis*): a foot incubator. **General and Comparative Endocrinology**, v. 64, n. 1, p. 112-121.
- Khan, M. Z.; McNabb, F. M. A.; Walters, J. R.; Sharp, P. J. (2001) Patterns of

testosterone and prolactin concentrations and reproductive behavior of helpers and breeders in the cooperatively breeding red-cockaded woodpecker (*Picoides borealis*). **Hormones and Behavior**, Academic Press v. 40, n. 1, p. 1–13.

Lormée, H.; Jouventin, P.; Lacroix, A.; Lallemand, J.; Chastel, O. (2000) Reproductive endocrinology of tropical seabirds: Sex-specific patterns in LH, steroids, and prolactin secretion in relation to parental care. **General and Comparative Endocrinology**, Academic Press v. 117, n. 3, p. 413–426.

Lovas, E.; Johnston, S.; Filippich, L (2010). Using a GnRH agonist to obtain an index of testosterone secretory capacity in the cockatiel (*Nymphicus hollandicus*) and sulphur-crested cockatoo (*Cacatua galerita*). **Australian Veterinary Journal**, v. 88, n. 1–2, p. 52–56.

Morinha, F., Cabral, J. A., & Bastos, E. (2012). Molecular sexing of birds: A comparative review of polymerase chain reaction (PCR)-based methods. **Theriogenology**, v. 78 n. 4, p. 703-714.

Norris, D. O. (2007) **Vertebrate endocrinology**. 4 ed. Elsevier Academic Press, 2007.

Norris, D. O., & Lopez, K. H. (Eds.). (2011). **Hormones and Reproduction of Vertebrates, Volume 4: Birds**. Academic Press.

Palme, R. (2005). Measuring fecal steroids: guidelines for practical application. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1046, n. 1, p. 75-80.

Palme, R.; Touma, C.; Arias, N.; Dominchin, M. F.; Lepschy, M. (2013) Steroid extraction: Get the best out of faecal samples. **Wiener Tierärztliche Monatsschrift**, v. 100, n. 9–10, p. 238–246.

Poiani, Aldo. (2008) "Same-sex mounting in birds: comparative test of a synthetic reproductive skew model of homosexuality." **The Open Ornithology Journal** 1.1.

Pukazhenthi, B. S.; Wildt, D. E. (2004) Which reproductive technologies are most relevant to studying, managing and conserving wildlife? **Reproduction, Fertility and Development**, v. 16, n. 2, p. 33-46.

Schwarzenberger, F. (2007) The many uses of non-invasive faecal steroid monitoring in zoo and wildlife species. **International Zoo Yearbook**, v. 41, n. 1, p. 52–74.

Sockman, K. W.; Schwabl, H.; Sharp, P. J. (2004) Removing the confound of time in investigating the regulation of serial behaviours: testosterone, prolactin and the transition from sexual to parental activity in male American kestrels. **Animal Behaviour**, v. 67, n. 6, p. 1151–1161.

Sperciski, K. M.; Morais, R. N.; Morato, R. G.; de Paula, R. C.; Azevedo, F. C.; May-Junior, J. A.; Santos, J. P.; Reghelin, A. L.; Wildt, D. E.; Songsasen, N. (2012). Adrenal activity in maned wolves is higher on farmland and park

boundaries than within protected areas. **General and comparative endocrinology**, v. 179, n. 2, p. 232-240.

Stavy, M.; Gilbert, D.; Martin, R. D. (1979) Routine determination of sex in monomorphic bird species using faecal steroid analysis. **International Zoo Yearbook**, v. 19, n. 1, p. 209–214.

Straube, F. C.; Bráz Guimarães Junior, A.; Vieira-Da-Rocha, M. C.; Pioli, D. (2010) **Glossário Brasileiro de Birdwatching**. Curitiba.

Touma, C.; Palme, R. (2005). Measuring fecal glucocorticoid metabolites in mammals and birds: the importance of validation. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1046, n. 1, p. 54-74.

Velloso, A. L.; Wasser, S. K.; Monfort, S. L.; Dietz, J. M. (1998). Longitudinal fecal steroid excretion in maned wolves (*Chrysocyon brachyurus*). **General and comparative endocrinology**, v. 112 p. 96–107.

Wild, D. (Ed.) (2013). **The immunoassay handbook: theory and applications of ligand binding, ELISA and related techniques**. Newnes.

Wingfield, J. C. (1994) Hormone-behavior interactions and mating systems in male and female birds. **The differences between the sexes**, v. 303, p. 330.

Zuk, M.; Bailey, N. W. (2008). Birds gone wild: same-sex parenting in albatross. **Trends in ecology & evolution**, v. 23, n. 12, p. 658-660.

CONCLUSÃO GERAL

A modernização das técnicas e o trabalho com amostras que diminuem o contato com o animal, mesmo assim trazendo bons resultados para as pesquisas e trabalhos de conservação, continuará crescendo, à medida em que a ciência da endocrinologia também se desenvolve.

Com base nas condições experimentais aqui descritas e nos resultados obtidos, pode-se concluir que:

- 1) O método de enzimoimunoensaio aqui descrito foi validado técnica e biologicamente, podendo ser usado em araras.
- 2) A sexagem de araras pode ser feita por análise não invasiva dos metabólitos de progestágenos de excretas, utilizando-se a técnica de enzimoimunoensaio (EIA).
- 3) As concentrações totais de metabólitos de androgênios, em excretas, foram similares entre fêmeas e machos reprodutivamente ativos neste grupo de araras. Desta forma, não foi possível determinar o sexo dos animais quando se utilizou apenas análise não invasiva de metabólitos uofecais de androgênios.
- 4) A taxa P/A, utilizada normalmente para espécies de mamíferos com estação reprodutiva bem definida, pode também ser utilizada para determinação sexual por análise não invasiva dos metabólitos de progestágenos e androgênios em excretas. Valores abaixo de 2 indicam com 90% de eficiência que as amostras são provenientes de machos. Ao contrário, são provenientes de fêmeas.

REFERÊNCIAS

- BENTLEY, G. E.; TSUTSUI, K.; WINGFIELD, J. C. (2007) Endocrinology of reproduction. In: JAMIESON, B. G. M. **Reproductive biology and phylogeny of birds – Part A**. Enfield: Science Publishers, cap. 5, p. 181-242.
- BERCOVITZ, A. B.; CZEKALA, N. M.; LASLEY, B. L. (1978) A new method of sex determination in monomorphic birds. **The Journal of Zoo Animal Medicine**, v. 9, n. 4, p. 114.
- BIRDLIFE INTERNATIONAL (2016) *Anodorhynchus hyacinthinus*. **The IUCN Red List of Threatened Species**: e.T22685516A93077457. <http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2016-3.RLTS.T22685516A93077457.en>. Acessado em 28 de maio de 2018.
- BIRDLIFE INTERNATIONAL (2016) *Ara chloropterus*. **The IUCN Red List of Threatened Species**: e.T22685566A93080287. <http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2016-3.RLTS.T22685566A93080287.en>. Acessado em 14 de maio de 2018.
- BIRDLIFE INTERNATIONAL (2016). *Anodorhynchus glaucus*. **The IUCN Red List of Threatened Species 2016**: e.T22685527A93078084. <http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2016-3.RLTS.T22685527A93078084.en>. Acessado em 11 February 2019.
- BIRDLIFE INTERNATIONAL (2017). *Anodorhynchus leari* (amended version of 2016 assessment). **The IUCN Red List of Threatened Species**. <http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2017-3.RLTS.T22685521A119259023.en>. Acessado em 11 February 2019.
- BIRDLIFE INTERNATIONAL (2018). *Ara ararauna*. **The IUCN Red List of Threatened Species 2018**. <http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2018-2.RLTS.T22685539A131917270.en>. Acessado em 7 February 2019.
- BIRDLIFE INTERNATIONAL (2019) *Ara macao*. **The IUCN Red List of Threatened Species 2016**. <http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2016-3.RLTS.T22685563A93079992.en>. Acessado em 14 de maio de 2018.
- BIRDLIFE. **State of the world's birds** (2018). Disponível em: https://www.birdlife.org/sites/default/files/attachments/bl_reporteng_v11_spreads.pdf. Acesso em: 11 maio. 2018
- BLANK, M. H.; MOREIRA, N. (2015) **Perfil anual de andrógenos em gaviões-reais (*Harpia harpyja*) e sua correlação com comportamento reprodutivo e fatores ambientais**. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Paraná.
- BROWN, J. (2008) Wildlife Endocrinology Manual. **Smithsonian National Zoological Park, Conservation and Research Center** (Publicação interna).
- BUCHANAN, K. L.; GOLDSMITH, A. R. (2004) Noninvasive endocrine data for behavioural studies: the importance of validation. **Animal Behaviour**, v. 67, n.

1, p. 183–185, 2004.

BUNTIN, J. D.; BECKER, G. M.; RUZYCKI, E. (1991) Facilitation of parental behavior in ring doves by systemic or intracranial injections of prolactin. **Hormones and Behavior**, v. 25, n. 3, p. 424–444. Academic Press.

CHESTER-JONES, I.; INGLETON, P. M.; PHILLIPS, J.G. (ed.) (1987). **Fundamentals of comparative vertebrate endocrinology**. Springer Science & Business Media, Plenum press.

CORNELL UNIVERSITY LABORATORY OF ORNITHOLOGY: **Handbook of Bird Biology**. John Wiley & Sons. 3ed. p 215-262.

CUNNINGHAM, J. G.; KLEIN, B. G. (2007) **Textbook of Veterinary Physiology**. Missouri: Saunders Elsevier, 2007.

DIAS, E. A.; OLIVEIRA, C. A. (2006) Determinação do sexo de psitacídeos por radioimunoensaio (RIE) de esteróides sexuais a partir de excretas cloacais. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**., v. 43, p. 5–11.

FERREIRA, J. C. P.; FUJIHARA, C. J.; FRUHVALLD, E.; TREVISOL, E.; DESTRO, F. C.; TEIXEIRA, C. R.; PANTOJA, J. C. F.; SCHMIDT, E. M. S.; PALME, R. (2015) Non-invasive measurement of adrenocortical activity in blue-fronted parrots (*Amazona aestiva*, Linnaeus, 1758). **PloS one**, v. 10, n. 12.

FONTENELE-NETO, J. D. (2012) Morfofisiologia da reprodução das aves: desenvolvimento embrionário, anatomia e histologia do sistema reprodutor. **Acta Veterinaria Brasilica**, v. 6, n. 3, p. 165–176.

FORSYTH, J. M. (2010) **Parrots of the world**. Princeton University Press.

GOYMANN, W. (2005) Noninvasive monitoring of hormones in bird droppings: physiological validation, sampling, extraction, sex differences, and the influence of diet on hormone metabolite levels. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1046, n. 1, p. 35–53.

GOYMANN, W. (2012) On the use of non-invasive hormone research in uncontrolled, natural environments: the problem with sex, diet, metabolic rate and the individual. **Methods in Ecology and Evolution**, v. 3, n. 4, p. 757–765.

GRATTO-TREVOR, C. L.; ORING, L. W.; FIVIZZANI, A. J. (1991) Effects of blood sampling stress on hormone levels in the semipalmated sandpiper. **Journal of Field Ornithology**, v. 62, n. 1, p. 19–27.

GRESPLAN, A.; RASO, T. F. Psittaciformes (Araras, Papagaios, Periquitos, Calopsitas e Cacatuas). In: CUBAS, Z. S.; SILVA, J. C. R.; CATÃO-DIAS, J. L. (2014) **Tratado de Animais Selvagens: Medicina Veterinária**. São Paulo: Roca

GRIFFITHS, R.; PHIL, D (2000). Sex identification in birds. **Seminars in avian**

and exotic pet medicine, v. 9, n. 1, p. 14–26.

GUEDES, N. M. R. (2004) Management and conservation of the large macaws in the wild. **Ornitologia Neotropical**, v. 15, p. 279-283.

GUEDES, N. M. R. (2009). **Sucesso reprodutivo, mortalidade e crescimento de filhotes de araras azuis *Anodorhynchus hyacinthinus* (Aves, Psittacidae) no Pantanal, Brasil**. Tese de Doutorado, Universidade Estadual de São Paulo (UNESP).

HALL, M. R. (1986) Plasma concentrations of prolactin during the breeding cycle in the cape gannet (*Sula capensis*): a foot incubator. **General and Comparative Endocrinology**, v. 64, n. 1, p. 112-121.

HEISTERMANN, M. Non-invasive monitoring of endocrine status in laboratory primates: methods, guidelines and applications. *Advances in Science and Research*, v. 5, n. 1, p. 1–9, 2010.

HODGES, K., BROWN, J. & HEISTERMANN, M. (2010) Endocrine monitoring of reproduction and stress. In: Kleiman, D. G.; Thompson, K. V.; C. Baer, K. (Eds.). **Wild mammals in captivity: Principles and techniques for zoo management**. 2. ed. Chicago, IL: University of Chicago Press. p. 447–468.

JAMIESON, B. G. M. (2007) **Reproductive biology and phylogeny of birds**. Science Publishers.

KHAN, M. Z.; MCNABB, F. M. A.; WALTERS, J. R.; SHARP, P. J. (2001) Patterns of testosterone and prolactin concentrations and reproductive behavior of helpers and breeders in the cooperatively breeding red-cockaded woodpecker (*Picoides borealis*). **Hormones and Behavior**, Academic Press v. 40, n. 1, p. 1–13.

KIME, D. E. The Steroids. (1987) **Fundamentals of Comparative Vertebrate Endocrinology**. p.3–56, 1987. Boston, MA: Springer US.

KLASING, K. C. (2005) Potential Impact of Nutritional Strategy on Noninvasive Measurements of Hormones in Birds. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1046, n. 1, p. 5–16.

LORMÉE, H.; JOUVENTIN, P.; LACROIX, A.; LALLEMAND, J.; CHASTEL, O. (2000) Reproductive endocrinology of tropical seabirds: Sex-specific patterns in LH, steroids, and prolactin secretion in relation to parental care. **General and Comparative Endocrinology**, Academic Press v. 117, n. 3, p. 413–426.

LOVAS, E.; JOHNSTON, S.; FILIPPICH, L (2010). Using a GnRH agonist to obtain an index of testosterone secretory capacity in the cockatiel (*Nymphicus hollandicus*) and sulphur-crested cockatoo (*Cacatua galerita*). **Australian Veterinary Journal**, v. 88, n. 1–2, p. 52–56.

LOVETTE, I. J.; FITZPATRICK, J. W (2016). **Handbook of Bird Biology**. Wiley.

- MCWILLIAMS, S.; ADKINS-REGAN, E.; VLECK, C. (2016) Bird Physiology. *In*: MORINHA, F., CABRAL, J. A., & BASTOS, E. (2012). Molecular sexing of birds: A comparative review of polymerase chain reaction (PCR)-based methods. **Theriogenology**, v. 78 n. 4, p. 703-714.
- MÖSTL, E.; PALME, R. (2002). Hormones as indicators of stress. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 23, p. 64-74.
- MÖSTL, E.; RETTENBACHER, S.; PALME, R. (2005) Measurement of corticosterone metabolites in birds' droppings: An analytical approach. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1046, p. 17–34.
- MOYES, C. D.; SCHULTE, P. M. (2014) **Principles of animal physiology**. 2º ed.
- NORRIS, D. O. (2007) **Vertebrate endocrinology**. 4º ed. Elsevier Academic Press.
- NORRIS, D. O., & LOPEZ, K. H. (Eds.). (2011). **Hormones and Reproduction of Vertebrates, Volume 4: Birds**. Academic Press.
- PALME, R. (2005). Measuring fecal steroids: guidelines for practical application. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1046, n. 1, p. 75-80.
- PALME, R.; TOUMA, C.; ARIAS, N.; DOMINCHIN, M. F.; LEPSCHY, M. (2013) Steroid extraction: Get the best out of faecal samples. **Wiener Tierärztliche Monatsschrift**, v. 100, n. 9–10, p. 238–246, 2013.
- POIANI, ALDO. (2008) "Same-sex mounting in birds: comparative test of a synthetic reproductive skew model of homosexuality." **The Open Ornithology Journal** 1.1.
- PROJETO ARARA AZUL. **Arara-azul-pequena**. Disponível em: <<http://www.projetoararaazul.org.br/arara/Home/AAraraAzul/Asararasazuais/Araraazulpequena/tabid/297/Default.aspx>>. Acesso em 29 de maio de 2018.
- PUKAZHENTHI, B. S.; WILDT, D. E. (2004) Which reproductive technologies are most relevant to studying, managing and conserving wildlife? **Reproduction, Fertility and Development**, v. 16, n. 2, p. 33-46.
- REECE, W. O.; ERICKSON, H. H.; GOFF, J. P.; UEMURA, E. E. (2017) **Dukes' physiology of domestic animals**. 13º ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.
- SCANES, C. G. (2015) **Sturkie's Avian Physiology**. 6º ed. Elsevier
- SCHWARZENBERGER, F. (2007) The many uses of non-invasive faecal steroid monitoring in zoo and wildlife species. **International Zoo Yearbook**, v. 41, n. 1, p. 52–74.
- SICK, H (1997) . **Ornitologia Brasileira**. Nova Front ed. Rio de Janeiro

SOCKMAN, K. W.; SCHWABL, H.; SHARP, P. J. (2004) Removing the confound of time in investigating the regulation of serial behaviours: testosterone, prolactin and the transition from sexual to parental activity in male American kestrels. **Animal Behaviour**, v. 67, n. 6, p. 1151–1161.

SPERCOSKI, K. M.; MORAIS, R. N.; MORATO, R. G.; DE PAULA, R. C.; AZEVEDO, F. C.; MAY-JUNIOR, J. A.; SANTOS, J. P.; REGHELIN, A. L.; WILDT, D. E.; SONGSASEN, N. (2012). Adrenal activity in maned wolves is higher on farmland and park boundaries than within protected areas. **General and comparative endocrinology**, v. 179, n. 2, p. 232-240.

STAVY, M.; GILBERT, D.; MARTIN, R. D. (1979) Routine determination of sex in monomorphic bird species using faecal steroid analysis. **International Zoo Yearbook**, v. 19, n. 1, p. 209–214.

STRAUBE, F. C.; BRÁZ GUIMARÃES JUNIOR, A.; VIEIRA-DA-ROCHA, M. C.; PIOLI, D. (2010) **Glossário Brasileiro de Birdwatching**. Curitiba.

TAYLOR, W. (1971) The excretion of steroid hormone metabolites in bile and feces. *Vitamins and Hormones*, Academic Press, v. 29.

TOUMA, C.; PALME, R. (2005). Measuring fecal glucocorticoid metabolites in mammals and birds: the importance of validation. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1046, n. 1, p. 54-74.

UNEP-WCMC (Comps.) (2018). **The checklist of cites species website. CITES secretariat, Geneva, Switzerland**. Compiled by UNEP-WCMC, Cambridge, UK. Disponível em: <http://checklist.cites.org>. acesso em 14 de maio de 2018.

VELLOSO, A. L.; WASSER, S. K.; MONFORT, S. L.; DIETZ, J. M. (1998). Longitudinal fecal steroid excretion in maned wolves (*Chrysocyon brachyurus*). **General and comparative endocrinology**, v. 112 p. 96–107.

WASSER, S. K.; HUNT, K. E. (2005). Noninvasive measures of reproductive function and disturbance in the barred owl, great horned owl, and northern spotted owl. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1046, n. 2005, p. 109–137.

WASSER, S. K.; HUNT, K. E.; BROWN, J. L.; COOPER, K.; CROCKETT, C. M.; BECHERT, U.; MILLSPAUGH, J. J.; LARSON, S.; MONFORT, S. L. (2000) A generalized fecal glucocorticoid assay for use in a diverse array of nondomestic mammalian and avian species. *General and Comparative Endocrinology*, v. 120, n. 3, p. 260–275.

WEHNER, R.; HANDKE, A. (1979) An improved extraction method for plasma steroid hormones. *Clinica Chimica Acta*, v. 93, p. 429-431.

WILD, D. (Ed.) (2013). **The immunoassay handbook: theory and applications of ligand binding, ELISA and related techniques**. 4 ed. Elsevier.

WINGFIELD, J. C. (1994) Hormone-behavior interactions and mating systems in male and female birds. **The differences between the sexes**, v. 303, p. 330.

ZUK, M.; BAILEY, N. W. (2008). Birds gone wild: same-sex parenting in albatross. **Trends in ecology & evolution**, v. 23, n. 12, p. 658-660.